

IMPLICATION DE LA THIAMINE ET DE SES ESTERS PHOSPHORIQUES DANS LA TRANSMISSION CHOLINERGIQUE

ETUDE EFFECTUEE
DANS L'ORGANE ELECTRIQUE DE LA TORPILLE

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en biologie médicale

par

Lorenza **EDER-COLLI**

de

Genève

Thèse No 15

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1979

IMPLICATION DE LA THIAMINE ET DE SES ESTERS PHOSPHORIQUES DANS LA TRANSMISSION CHOLINERGIQUE

ETUDE EFFECTUEE
DANS L'ORGANE ELECTRIQUE DE LA TORPILLE

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en biologie médicale

par

Lorenza EDER-COLLI

de

Genève

Thèse No 15

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1979

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Yves Dunant, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 1er février 1979

Le doyen :
André Cruchaud

Thèse No 15



Je tiens à exprimer ici toute ma reconnaissance au professeur Y. Dunant qui a dirigé cette thèse. Son amitié et son enthousiasme m'ont été très précieux tout au long de ce travail.

Je remercie sincèrement le professeur R.W. Straub, qui m'a accueillie dans son Institut et m'a permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions qui soient.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame N. Collet pour sa patience et son sens de l'esthétique lors de la frappe du manuscrit, ainsi que Monsieur F. Pillonnel pour la réalisation des nombreuses figures.

J'exprime également ma reconnaissance à Monsieur M. Baumann de l'Institut d'histologie, Genève, pour sa collaboration dans les expériences d'histofluorescence.

Je remercie également Mesdames L. Servetiadis-Hirt et R. Rochat, Messieurs S. Ferrara et A. Masiero, pour leur précieuse aide technique, et le docteur J. Corthay pour sa lecture du manuscrit.

De plus, je voudrais encore remercier très sincèrement tous mes collègues de travail qui, par leur amitié et leur collaboration, ont su créer une atmosphère de travail très agréable.

TABLE DES MATIERES

	PAGES
ABREVIATIONS	5
<u>I. INTRODUCTION</u>	6
I.1. THIAMINE ET FONCTIONNEMENT DES TISSUS NERVEUX	7
I.2. DESCRIPTION DE L'ORGANE ELECTRIQUE ET SES PROPRIETES	10
<u>II. IDENTIFICATION DE LA THIAMINE ET DE SES ESTERS-PHOSPHORIQUES DANS L'ORGANE ELECTRIQUE DE LA TORPILLE.</u>	14
II.1. EXTRACTION ET DOSAGES	15
Matériel et Méthodes :	15
- Provenance des Torpilles et préparation des fragments d'organe électrique	15
- Procédé :	19
1. extraction	19
2. séparation de la thiamine et ses esters phosphoriques et dosage	20
3. précision de la méthode	25
4. reproductibilité	31
5. dosage de l'ACH	33
Résultats et conclusions	36
II.2. HISTOFLUORESCENCE DE LA THIAMINE DANS L'ORGANE ELECTRIQUE	41
Matériel et Méthodes	41
Résultats :	45
- Analyse spectrale sur les coupes de tissu	46
- Fluorescence observée par balayage	47
- Histofluorescence sur coupe d'autres tissus	54
- Signification des résultats obtenus	55

	PAGES
II.3. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DE L'ORGANE ELECTRIQUE. PREPARATION DES SYNAPTOSOMES ISOLEES.	57
Matériel et Méthodes	57
- Procédé :	58
. dosages biochimiques	60
. contrôles morphologiques	61
Résultats	62
- Aspect des gradients et contrôles morphologiques	63
- ACh, enzymes et protéines	65
- Distribution et récupération des thiamines	69
- Relation entre la TTP et l'ACh	74
II.4. DISCUSSION	76
III. <u>VARIATIONS DE LA THIAMINE, DE SES ESTERS-P ET DE L'ACh DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES.</u>	78
III.1. STIMULATION ELECTRIQUE DU TISSU.	79
Matériel et Méthodes	81
- Procédé :	81
. stimulations	81
. inactivation du tissu et extraction de l'ACh et des thiamines	81
Résultats	82
- Libération de thiamine par la stimulation	82
- Variations dans le tissu :	83
. variations de la thiamine totale et de l'ACh	83
. variations de la thiamine et de ses esters-P	86
Discussion	88
III.2. HOMOGENEISATION DU TISSU	91
Matériel et Méthodes	91
Résultats	92
Discussion	97

	PAGES
III.3. MODIFICATION DES CONCENTRATIONS DE Ca^{2+} et Mg^{2+} DANS LE MILIEU EXTERIEUR.	99
Matériel et Méthodes	100
Résultats	102
- Effets sur le tissu entier	102
- Effets de l'homogénéisation	106
- Cas particuliers : effets du Ca^{2+} et du Mg^{2+} ajoutés lors de l'homogénéisation	110
Discussion	113
III.4. DISCUSSION	115
IV. <u>INCORPORATION DE LA THIAMINE EXOGENE.</u>	116
Matériel et Méthodes	118
- Procédé :	118
. incorporation en fonction du temps d'incubation	119
. incorporation en fonction de la concentration de la thiamine externe	119
. effets de l'acétate et de la choline sur l'incorporation	120
Résultats	125
- Incorporation en fonction de la durée d'incubation	125
- Incorporation en fonction des concentrations de thiamine exogène	127
- Effets de la choline et de l'acétate sur l'incor- poration	130
Discussion	132
V. <u>EFFETS DE LA THIAMINE EXOGENE SUR LE METABOLISME DE L'ACH.</u>	136
V.1. EFFETS DE LA THIAMINE ET ANTIMETABOLITES	137
Matériel et Méthodes	139
- Procédé :	140
A. Effets de la thiamine exogène et anti- métabolites sur la réponse électro- physiologique.	141

	PAGES
B. Libération de l'ACh ; effets de la thiamine et de l'oxythiamine.	142
Résultats :	144
A. Effets de la thiamine exogène et anti-métabolites sur la réponse électrophysiologique :	144
- effets de la thiamine	145
- effets de l'oxythiamine et de la pyrithiamine	147
B. Libération de l'ACh ; effets de la thiamine et de l'oxythiamine :	150
- effets de la thiamine et de l'oxythiamine	152
- effets de la thiamine et de l'oxythiamine sur l'activité de l'AChE	155
Discussion	156
V.2. EFFETS DE LA THIAMINE EXOGENE SUR L'INCORPORATION DE LA CHOLINE ET DE L'ACETATE DANS L'ACh.	159
Matériel et Méthodes	159
Résultats :	160
- Incorporation de la radioactivité totale	161
- Incorporation de la ^3H -Choline et du ^{14}C -Acétate dans l'ACh	161
Discussion	164
VI. <u>RESUME ET CONCLUSIONS.</u>	166
VI.1. RESUME	167
VI.2. CONCLUSIONS	171
VII. <u>BIBLIOGRAPHIE.</u>	176

ABREVIATIONS

AcTase	Acétyltransférase
AcétylCoA	Acétylcoenzyme A
• ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
CAT	Choline-acétyltransférase
EBC	Ethylbutylcétone
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
Enz.-L	Enzyme de libération
E-P ou esters-P	Esters phosphoriques de la thiamine
HOM	Homogénat
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Pi	Phosphate inorganique
TCA	Acide trichloracétique
Thia	Thiamine (vitamine B ₁ , aneurine)
TMP	Thiamine monophosphate
TPP	Thiamine diphosphate (cocarboxylase)
TTP	Thiamine triphosphate
TTPase	Thiamine triphosphatase
TPB	Tétraphénylboron
TPBNa	Tétraphénylborate de sodium
TOT	Total

I

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

I.1. THIAMINE ET FONCTIONNEMENT DES TISSUS NERVEUX.

La carence en vitamine B₁, ou thiamine, entraîne une séquence de troubles graves, tels que désordres neurologiques, anorexie, perte de poids, cardiomégalie et bradycardie. Ces symptômes s'observent chez des individus souffrant de Béri-Béri, d'encéphalopathie de Wernicke, ainsi que d'encéphalomyélopathie subaiguë nécrosante (maladie de Leigh).

En 1936, Peters découvre dans le cerveau, le rôle essentiel de la vitamine dans le métabolisme du pyruvate et Lohmann (1937) démontre que la thiamine-diphosphate (TPP) ou cocarboxylase, constitue le cofacteur actif de la pyruvate déshydrogénase ; sous cette forme, la thiamine est également cofacteur pour l' α -cétoglutarate déshydrogénase et la transcétolase. Toutefois, dans une carence en thiamine, les troubles neurologiques apparaissent généralement bien avant l'altération de ces systèmes enzymatiques (Dreyfus et Hauser, 1964). Minz, en 1938, observe que la stimulation électrique d'un nerf isolé, induit une libération importante de thiamine. Cette constatation, élargie à d'autres tissus nerveux, est confirmée par la suite par de nombreux autres auteurs (von Muralt, 1947; Gurtner, 1960 ; Cooper et coll., 1963 ; Itokawa et Cooper, 1970). Ce phénomène a conduit à l'hypothèse d'un double rôle de la thiamine dans le fonctionnement des tissus nerveux, à savoir, son rôle bien connu de coenzyme (cocarboxylase) dans le métabolisme général, et, en plus,

une fonction neuronale spécifique, inconnue, dans les mécanismes de l'excitabilité. Ceci a été testé en faisant appel à un certain nombre d'antimétabolites de la thiamine. Parmi eux, l'oxythiamine, la pyrithiamine et la néopyrithiamine sont des antimétabolites synthétiques, qui, par analogie de structure, déplacent la vitamine de son site d'action (Cerecedo et coll., 1951). D'autres antimétabolites naturels, agissent en changeant la structure de la vitamine, la rendant ainsi inactive (Somogyi, 1956).

Deux approches expérimentales tentent de démontrer la responsabilité de la thiamine dans la genèse et la propagation du potentiel d'action. Dans la première, des études préliminaires de Kunz (1956), développées plus récemment par Armet et Cooper (1965), puis par Barchi (1976), ont cherché à montrer les effets des antimétabolites de la thiamine, sur des nœuds de Ranvier isolés. De ces travaux, il ressort la suggestion selon laquelle la thiamine, ou l'un de ses esters phosphoriques, interviendrait comme catalyseur dans le contrôle de la perméabilité sodique. Toutefois, Goldberg et Cooper (1975), mettent en doute cette interprétation, en démontrant que ces antimétabolites agissent comme les anesthésiques locaux ; ils auraient donc une action non spécifique au niveau des membranes excitables. La seconde approche est constituée par des expériences similaires de Fox et Duppel (1975) ; la thiamine ralentit le déclin exponentiel des courants ioniques (Na^+ , K^+), qui se produit normalement au cours de l'expérience in vitro ; cet effet est rapide et très manifeste avec la TPP et surtout la TTP. Les auteurs concluent que les esters phosphoriques de la

thiamine contribuent au maintien de charges négatives fixes, à la surface interne de la membrane.

Les travaux biochimiques récents sont intéressants pour la neuropathologie ; ils tendent à démontrer que la TTP serait le composé spécifique, associé au fonctionnement de la membrane excitable (Itokawa et coll., 1972). Cooper et coll. (1969) trouvent des taux anormalement faibles de TTP dans le cerveau d'enfants atteints de la maladie héréditaire de Leigh. L'urine, le sang et le liquide céphalorachidien de ces malades, contiennent un inhibiteur de la TPP-ATP phosphoryltransférase, responsable de la synthèse de la TTP.

Les effets d'une carence en thiamine sur la transmission synaptique n'ont pas encore été explorés pleinement. Des altérations dans le métabolisme des aminoacides, et parmi eux ceux considérés comme des neurotransmetteurs, ont été démontrés (Gaitonde et Fayein, 1975) ; toutefois les altérations du GABA et du glutamate, ne présentent aucune corrélation avec les troubles neurologiques (Gubler et coll., 1974). Les études cytochimiques, en microscopie électronique, ont révélé la présence des enzymes hydrolysant les esters phosphoriques de la thiamine, dans les vésicules synaptiques ; toutefois, ces enzymes ne semblent pas présenter des changements significatifs, lors d'une déficience en vitamine B₁ (Ogawa et coll., 1976).

Les résultats concernant les taux d'ACh lors d'une carence thiaminique, sont contradictoires : en 1940, Mann et Quastel constatent qu'une telle carence interfère avec la synthèse de l'ACh dans le système nerveux central ; Heinrich et coll. (1973) trouvent que les taux d'ACh et d'AcétylCoA, dans le cerveau de rats carencés, diminuent significativement ; pour

Reynolds et Blass (1975), par contre, ces taux restent constants. D'autre part, dans le ganglion cervical supérieur de rat, carencé en thiamine, la transmission synaptique, durant la stimulation répétitive, est fortement altérée, alors que la conduction dans les fibres nerveuses pré-ganglionnaires, n'est pas affectée (Perri et coll., 1970) ; cette diminution dans l'efficacité de la transmission serait due à un déficit de la synthèse de l'ACh (Sacchi et coll., 1978).

Au cours de ce travail, nous allons étudier l'implication possible de la thiamine dans les phénomènes de transmission synaptique, plus précisément en recherchant une intervention de la thiamine dans le métabolisme de l'ACh. Cette étude est effectuée sur l'organe électrique de Torpille (Torpedo marmorata), où la transmission est purement cholinergique (Feldberg et coll., 1940).

I.2. DESCRIPTION DE L'ORGANE ELECTRIQUE ET SES PROPRIETES.

La Torpille appartient à la famille des Elasmobranches marins. Elle possède deux organes électriques, disposés par paire, symétriquement par rapport à l'axe cérébro-spinal. Chaque organe est composé de 400 à 500 prismes hexagonaux, placés verticalement, côte à côte. Un prisme est formé par l'empilement d'environ 500 électroplaques, minces lamelles de 10 à 15 μ d'épaisseur, séparées par un espace interlamellaire. L'électroplaque, totalement dépourvue de matériel contractile, est comparable à une plaque motrice plutôt qu'à une fibre musculaire. Sa face ventrale est totalement recouverte de

terminaisons nerveuses. Lors de la décharge électrique, ces terminaisons libèrent de l'acétylcholine (ACh), qui, agissant sur la membrane post-synaptique, y déclenche l'entrée d'une grande quantité de sodium. L'électroplaque est incapable d'engendrer et de propager un potentiel d'action. La décharge de l'organe électrique correspond à la somme des potentiels de chaque électroplaque (Bennet et coll., 1961 ; Dunant, 1976).

Le contenu en ACh de l'organe électrique est élevé (500 à 800 nmoles/g de tissu frais). L'homogénéisation du tissu et son fractionnement subcellulaire ont permis de définir deux compartiments d'ACh : un compartiment dit "lié", résistant à l'hydrolyse par les cholinestérases du tissu ; ce "pool" est associé aux vésicules synaptiques (Israël et coll., 1968 ; Marchbanks et Israël, 1971) ; un second compartiment, désigné par ACh "libre" ou "disponible", correspondant au médiateur hydrolysé enzymatiquement lors de l'homogénéisation ; sa localisation cellulaire est supposée cytoplasmique. Au repos, ces deux compartiments sont de taille équivalente (300 à 400 nmoles/g) et leur importance relative semble réglée par la concentration en Ca^{2+} (Babel-Guérin, 1974 ; Israël et coll., 1977). Une stimulation répétitive de l'organe électrique induit des changements importants des taux d'ACh totale ; ces variations sont de deux types : une oscillation lente, sur laquelle se superpose une oscillation rapide, non amortie. Ces deux variations ne semblent concerner que le compartiment "libre" du transmetteur, qui est utilisé et renouvelé pendant l'activité (Dunant et coll., 1972 ; 1974 b ; 1977). L'oscillation rapide présente une période de 4 à 5 secondes

et son amplitude engage les 30 % de l'ACh totale du tissu, Dans l'organe électrique, une telle oscillation rapide, en phase avec celle de l'ACh, se produit également pour l'ATP (Israël et coll., 1977).

La vitesse de synthèse de l'ACh, dans le tissu entier ou dans les synaptosomes, peut être suivie grâce à l'incorporation, soit de choline radioactive, soit d'un précurseur marqué de l'AcétylCoA. A l'inverse du système nerveux central, où le glucose et le pyruvate sont les meilleurs précurseurs de la portion acétyle de l'ACh, l'organe électrique y incorpore préférentiellement de l'acétate (Israël et Tuček, 1974).

* * *
* *

Etant donné le caractère purement cholinergique de l'organe électrique, son abondante innervation, ainsi que les taux élevés d'ACh qu'il renferme, ce tissu présente un système particulièrement favorable pour la recherche d'une relation ACh-Thiamine.

Les problèmes essentiels que nous nous proposons d'étudier sont les suivants :

- dans l'organe électrique, la synthèse de l'ACh, à partir de l'acétate et de la choline, est-elle dépendante de quelque manière, de la thiamine ou l'un de ses esters phosphoriques ?
- les composés thiaminiques peuvent-ils agir sur la libération du transmetteur et par là, modifier l'efficacité de la transmission ?

- si une action de la vitamine se manifestait, tant au niveau de la synthèse que de la libération du transmetteur, ces effets proviennent-ils d'un rôle unique ou de deux implications distinctes de la thiamine dans le métabolisme de l'ACh ?

Dans une première approche, nous allons déterminer les taux de thiamine totale du tissu électrogène, ainsi que la répartition en thiamine et esters phosphoriques. La localisation cellulaire et subcellulaire de la vitamine, sera analysée par des techniques d'histofluorescence et de fractionnement subcellulaire. Nous allons ensuite considérer les variations de la thiamine et des esters phosphoriques, dans les conditions expérimentales connues pour induire des changements importants dans l'ACh. De plus, l'incorporation et la métabolisation de la thiamine radioactive sera étudiée. Des techniques électrophysiologiques et radiochimiques nous permettront d'investiguer l'action de la thiamine exogène et de quelques antimétabolites, sur la réponse électrophysiologique, ainsi que sur la libération du transmetteur. Finalement l'incorporation de l'acétate et de la choline radioactifs dans la molécule d'ACh, en présence de thiamine, sera brièvement analysée.

II

IDENTIFICATION DE LA THIAMINE ET DE SES ESTERS PHOSPHORIQUES
DANS L'ORGANE ELECTRIQUE DE LA TORPILLE.

II.1. EXTRACTION ET DOSAGES

MATERIEL ET METHODES

PROVENANCE DES TORPILLES ET PREPARATION DES FRAGMENTS D'ORGANE ELECTRIQUE.

Les Torpilles (Torpedo marmorata) nous parviennent vivantes de la Station de Biologie Marine d'Arcachon. Les poissons, le plus souvent des femelles adultes de 30 à 60 cm de long, sont maintenus vivants dans un bassin d'eau de mer artificielle ; ils sont généralement utilisés en l'espace de 2 ou 3 semaines suivant leur envoi.

Après anesthésie de l'animal à la tricaïne (MS 222, Sandoz), à raison de 1 g pour 3 litres d'eau de mer, l'organe électrique est découpé en tranches minces, dont les lambeaux de peau ventrale et dorsale sont éliminés. Des fragments comportant 1 à 3 prismes (0,3 à 0,5 g selon la taille du poisson) sont excisés et maintenus pendant environ 1 heure dans un tampon physiologique adapté au milieu extracellulaire des Elasmobranches ; nous désignerons ce milieu par tampon Torpille. Cette incubation sert à atténuer les effets dûs à l'excision. Dans ces conditions, le tissu électrogène conserve pendant plusieurs heures ses propriétés physiologiques, biochimiques et morphologiques (Dunant et coll., 1972).

Composition du tampon Torpille : NaCl, 280 mM ; KCl, 7 mM ; MgCl₂, 1,3 mM ; CaCl₂, 4,4 mM ; NaHCO₃, 5 mM ; NaH₂PO₄, 1,2 mM ; urée, 300 mM ; glucose, 5,5 mM. L'osmolarité est de 800 à 900 mOsm. Cette solution est équilibrée pendant 15 min avec un courant d'oxycarbonate (CO₂, 5 % ; O₂, 95 %). Le pH final est de 7 - 7,2.

Principe de la méthode.

La thiamine et ses esters phosphoriques (esters-P) sont extraits des fragments d'organe électrique par déprotéinisation à l'acide trichloracétique, puis séparés par électrophorèse à haute tension ; ces composés sont ensuite transformés en leurs thiochromes par oxydation avec une solution alcaline de ferricyanure de potassium (FeK₃(CN)₆) (Fig.II.1.1). Ces thiochromes, présentant une fluorescence bleue-violette, sont alors élués dans le milieu réactionnel où l'excès de réactif a été détruit par de l'eau oxygénée. La fluorescence des éluats est mesurée par fluorimétrie ; les taux de thiamine et de chaque ester sont déterminés graphiquement à l'aide de courbes standards.

Réactifs.

1. Solution de TCA à 5 % (p/v).
2. Diéthyléther saturé en H₂O b.d.
3. Tampon d'électrophorèse : pyridine, 20 ml ; acide acétique glacial, 8 ml ; ad 3 litres H₂O b.d. ; EDTA, 5 mM ; pH 5,2. Les groupes phosphoriques des esters-P étant susceptibles de former des sels de calcium ou de magnésium, insolubles, l'adjonction d'EDTA dans le tampon d'électrophorèse s'avère indispensable.

FIG. II. 1.1.

FORMATION DU THIOCHROME

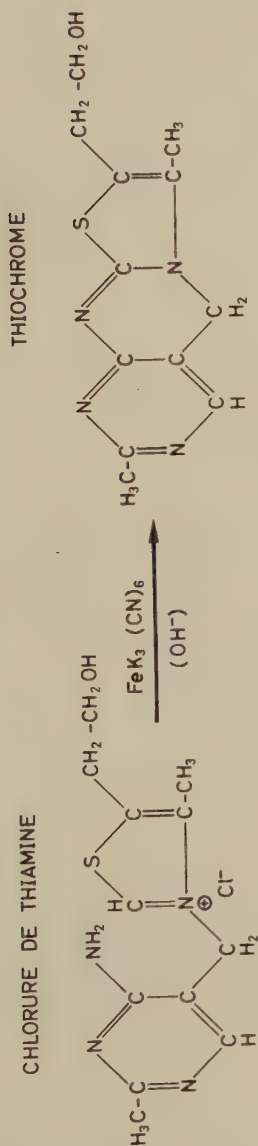


Fig. II.1.1 : La conversion de la molécule de thiamine en thiochrome implique une déshydrogénation du groupe amino libre, avec formation d'une double liaison conjuguée avec le noyau pyrimidique.

4. Réactif d'oxydation : cette solution est préparée extemporanément ; 0,58 ml d'une solution de $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$ à 4 % (p/v), sont ajoutés à 7,5 ml de NaOH 30 % (p/v). Le tout est dilué à 92 ml par du méthanol 50 % (v/v). La présence de méthanol favorise beaucoup la formation du thiochrome et augmente significativement la fluorescence obtenue ; plusieurs auteurs ont décrit ce phénomène (Risinger et Pell, 1965 ; Wostmann et Knight, 1960). L'intensité de la fluorescence croît dans le sens $\text{TTP} < \text{TMP} \leq \text{TPP} < \text{Thia}$.

5. Solution méthanolique à 50 % d' H_2O_2 à 0,5 % (v/v) servant à l'arrêt de la réaction.

6. Solutions de sulfate de quinine, utilisées pour la standardisation du fluorimètre ; une solution-mère à 2 mg/ml de H_2SO_4 , 0,1 N, est diluée selon la sensibilité voulue de l'appareil.

7. Solutions standards de thiamine plus esters-P ; la solution-mère est constituée d'un mélange à 250 $\mu\text{g/ml}$ de chaque composante. La Thiamine-HCl et la TPP proviennent de la maison Merck ; la TMP de Sigma & Co et la TTP est un don de Sankyo & Co (Japon).

Tous les réactifs doivent être exempts de fluorescence et de H_2O b.d. doit être utilisée.

Matériel.

L'électrophorèse à haute tension est effectuée avec un appareil CAMAG muni d'une platine de refroidissement qui assure un transfert calorifique optimal ; l'eau de refroidissement circule à 2 l/min et maintient une température de 10°C durant toute l'électrophorèse.

La sortie est de 0 à 5000 volts avec une intensité maximale de 200 mA. Les électrophorégrammes sont développés sur des papiers Schleicher et Schüll 2043 A, 20 x 40 cm. Une lampe UV universelle CAMAG, réglable à 366 nm et 256 nm, permet de visualiser les spots fluorescents sur l'électrophorégramme.

La fluorescence des échantillons est déterminée dans un fluorimètre Perkin-Elmer 204, muni d'une lampe à vapeur de Hg comme source d'irradiation et d'un système à 2 monochromateurs continus pour l'émission et l'excitation.

Procédé.

1. Extraction : l'extraction des composés par le TCA est controversée par différents auteurs (Myint et Houser, 1965 ; Lewin et Wei, 1966) qui affirment qu'une perte importante, par adsorption non spécifique des composés, se produit ainsi qu'une hydrolyse considérable des esters-P. Toutefois il faut noter que ce milieu reste le plus employé et paraît satisfaisant à la majorité des auteurs.

Nous avons testé l'extraction par du H_2SO_4 , 0,1 N, ainsi que par du HCl, 0,1 N, dans un bain-marie bouillant ; les résultats obtenus s'avèrent moins satisfaisants qu'avec le TCA à froid ; il semble que la thiamine en solution aqueuse diluée soit peu stable à chaud (Boissier et coll, 1966).

Après incubation préalable, à 4°C, pendant 1 heure dans du TCA 5 %, les fragments de tissu sont homogénéisés

dans ce milieu au moyen d'un homogénéisateur de Potter ; la concentration en tissu dans l'homogénat final est généralement de 0,2 à 0,3 g/ml ; les suspensions sont centrifugées à 10'000 x g, pendant 15 min, dans une centrifugeuse Sorvall (Rotor SS34) ; selon les besoins, le culot est utilisé pour la détermination des protéines. 1 ml de surnageant est alors lavé 3 à 4 fois avec environ 15 ml de diéthyléther saturé en H₂O, jusqu'à obtention d'un pH 4-5 ; entre chaque lavage, l'éther est éliminé par aspiration ; à la fin des opérations, les résidus d'éther sont évaporés par un courant de N₂ gazeux.

2. Séparation de la thiamine et ses esters phosphoriques et dosage : La méthode décrite consiste en une modification de celle employée par Itokawa et Cooper (1976) ; elle permet une séparation rapide des composés (20 min) et présente une sensibilité élevée (0,05 µg).

La thiamine fut l'une des premières substances biologiques testée par des méthodes de fluorescence. Le dosage par oxydation quantitative de la molécule de thiamine en son thiochrome fut proposé par Jansen, en 1936. Toutefois le mécanisme exact de la réaction n'est pas encore résolu ; il semblerait qu'en cours d'oxydation, non seulement le thiochrome mais également un disulfure de thiamine, non fluorescent, se forment, leurs proportions étant fonction du pH (Kawasaki, 1963 ; Risinger et Pell, 1965). La plupart

des méthodes de dosage existantes sont des modifications de celle décrite par Burch et coll. (1952) ; cette technique convient pour de faibles quantités de thiamine totale, déterminée après hydrolyse enzymatique des esters-P ; toutefois les études sur la biosynthèse et le métabolisme de la thiamine et ses esters nécessitent une séparation de ces composantes dans des extraits biologiques ou des solutions d'incubation ; plusieurs techniques de séparation sont utilisées, telles que chromatographie sur papier, sur couches minces, sur échangeurs d'ions ainsi que l'électrophorèse.

L'électrophorèse à haute tension a été retenue comme la meilleure méthode de séparation de la thiamine et ses esters (Fig. II.1.2). Deux autres techniques ont été testées auparavant : la chromatographie sur échangeur cationique (Amberlite IRC-50, 50 - 100 meshs, sous forme H^+) (Rossi-Fanelli et coll., 1961), ainsi que la chromatographie sur papier (Lewin et Wei, 1966) ; toutes deux n'assurent qu'une séparation partielle des composés.

A. Etablissement des courbes standards : les extraits d'organe électrique contiennent une assez forte concentration de sels (surtout NaCl) et d'urée ; de ce fait, lors de l'électrophorèse, la migration des composés peut être retardée ; pour l'établissement des courbes standards il faut tenir compte de ce phénomène et diluer les standards (Thia + esters) dans un milieu équivalent à celui des extraits ; nous avons utilisé le milieu suivant : 1 part du tampon Torpille + 3 parts

FIG. II.1. 2.



Figure II.1.2 : Séparation d'un mélange standard (Thia + esters-P en solution dans de l' H_2O b.d. ; l'électrophorèse à haute tension s'effectue en tampon pyridine-acide acétique, EDTA 5 mM, pH 5,2, à 4'500 V, pendant 20 minutes, 60 mA ; les spots sont révélés par vaporisation avec le réactif d'oxydation.

FIG. II.1. 3.

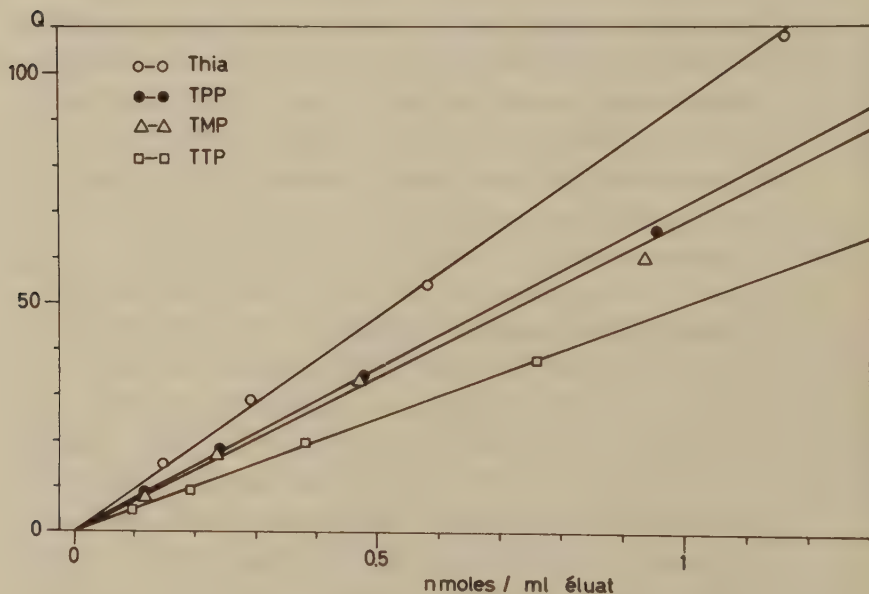


Figure II.1.3 : Courbes standards de dosage pour la thiamine, la TMP, la TPP et la TTP, obtenues après électrophorèse à haute tension du mélange de standards. Intensité de la fluorescence (Q) en fonction de la concentration de chaque standard dans l'éluat final (nmoles/ml).

de TCA 5 % ; cette solution est lavée avec du diéthyléther de façon identique aux extraits ; nous désignerons ce milieu par TCA salin.

20 μ l de chaque dilution standard sont appliqués sur le papier d'électrophorèse préalablement imprégné de tampon et séché régulièrement entre deux papiers filtres ; la ligne de départ est tracée à 10 cm de l'extrémité de la feuille placée du côté anodique ; l'électrophorèse est menée à 4500 volts, pendant 20 minutes, sous un courant constant de 60 mA ; les électrophorégrammes sont séchés à l'air et vaporisés légèrement avec le réactif d'oxydation ; les spots fluorescents en bleu violet sont visualisés sous la lampe UV, à 366 nm, et découpés ; des surfaces de papier adjacentes, de même taille, mais non fluorescentes sont également découpées et serviront à déterminer les blancs. Les papiers sont alors déposés dans des fioles de verre contenant 3,5 ml du réactif d'oxydation (pH 11) ; après 2 min la réaction est stoppée par adjonction de 0,5 ml de la solution de peroxyde ; cette étape est nécessaire puisqu'elle empêche une destruction du thiochrome formé par un excès de réactif. L'élution se poursuit dans ce milieu pendant 45 minutes. Les éluats sont transférés dans des cuvettes de quartz ($L = 1$ cm) et la fluorescence de chaque composante est lue. Pour le thiochrome, le fluorimètre utilisé indique des longueurs d'onde optimales d'excitation et d'émission à 365 nm et 450 nm respectivement.

Les courbes standards permettant le dosage de chaque composante sont tracées sur la figure II.1.3 ; la concentration du standard est exprimée en nmoles/ml d'éluat ;

les poids moléculaires suivants sont considérés : 337 pour la Thia-HCl, 417 pour la TMP, 496 pour la TPP et 513 pour la TTP. Dans nos conditions, la relation entre l'intensité de la fluorescence (Q) et la concentration est linéaire entre 0,02 et 5 nmoles/ml d'éluat dosé, ceci pour chaque standard ; toutefois il faut remarquer que la lecture aux faibles concentrations est très approximative, le bruit de fond de l'appareil devenant trop important.

B. Traitement des échantillons : la méthode décrite ci-dessus est appliquée aux extraits tissulaires. La faible concentration en thiamine et esters-P rend impossible leur visualisation après électrophorèse ; leur migration est donc localisée par co-migration d'une solution concentrée de standards dont 20 μ l sont déposés de chaque côté du papier d'électrophorèse.

La teneur, C, en nmoles/g, de chaque composante, se calcule comme suit :

$$C \left[\text{nmoles/g} \right] = \frac{X \left[\text{nmoles/ml éluat} \right] \times F}{E \left[\text{g/ml} \right]}$$

où, X = concentration de chaque composante dans l'éluat ;
cette valeur se détermine graphiquement d'après les courbes standards de dosage.

F = facteur de dilution de l'extrait dans l'éluat dosé.

E = concentration du tissu, calculée en g/ml d'extrait
TCA

3. Précision de la méthode : Etant donné qu'il n'existe aucune méthode de dosage indépendante permettant une comparaison, la précision de la méthode s'apprécie à l'aide du calcul des récupérations.

A. En absence de tissu : le tableau II.1.1. montre les récupérations obtenues après électrophorèse et élution d'un mélange standard de Thia et esters, à 125 µg/ml de chaque composé ; 20 µl de ces échantillons, préparés soit en milieu H₂O b.d. soit en TCA salin, sont soumis à 4 électrophorèses parallèles ; après élution et dosage, le calcul suivant permet de déterminer les récupérations pour chaque standard :

$$\frac{\text{Fluorescence après électrophorèse-Blanc}}{\text{Fluorescence avant électrophorèse-Blanc}} \times 100$$

La fluorescence avant l'électrophorèse est mesurée sur chaque standard séparément, en concentration identique à celle théoriquement présente dans l'éluat, si la récupération était de 100 %. Les blancs s'obtiennent en omettant le FeK₃(CN)₆ dans le milieu de réaction.

En milieu H₂O b.d., les récupérations paraissent totales pour chaque composante. Dans ce cas nous pouvons conclure que, a) aucune perte significative se produit lors de l'application de l'échantillon sur le papier d'électrophorèse humide ; b) une hydrolyse des esters-P ne paraît pas se produire en cours d'électrophorèse ; c) le méthanol à 40 % du milieu d'élution permet une solubilisation complète des thiochromes formés ; le temps d'élution est adéquat (45 min) ; d) l'intensité

TABLEAU II.1.1

COMPOSANTE	SOLVANT	RECUPERATION MOYENNE (%)
THIA	H ₂ O B.D.	96 ± 3
TMP		102 ± 5
TPP		109 ± 4
TTP		101 ± 12
THIA	TCA SALIN	96 ± 1
TMP		72 ± 3
TPP		80 ± 2,5
TTP		65 ± 11

Récupérations calculées après électrophorèse d'un mélange standard à 100 µg/ml de chaque composante ; pour chaque solvant testé, 4 électrophorèses sont effectuées.

de la fluorescence n'est pas atténuée par d'éventuels composés libérés par le papier dans le milieu d'éluion. Ces remarques sont valables pour de faibles comme pour de fortes concentrations des standards.

Par contre, en milieu TCA salin, la récupération des trois esters-P diminue considérablement ; la présence de sels et d'urée semble affecter la migration électrophorétique de ces composés, dont les spots fluorescents apparaissent plus diffus et par conséquent plus difficiles à délimiter avec précision. Pour atténuer l'effet des sels, deux tentatives de dessalage ont été expérimentées. Dans un premier essai, un mélange de standards dans le milieu salé a été appliqué sur une colonne de charbon actif traité au stéarate de cholestéryle (Siliprandi et Siliprandi, 1954) ; des résultats peu satisfaisants ont été obtenus ; le rendement de l'éluion de la colonne, soit par de l'éthanol à 50 % (v/v), soit par du propanol à 10 % (v/v), n'atteint que 20 à 40 % pour la totalité des composés. Dans un second essai nous avons employé une colonne de dessalage AG 11A8 (Bio-Rad, 50-100 meshes) doublement chargée ; dans l'éluat, le chlore a été dosé par précipitation à l' AgNO_3 ; la figure II.1.4 montre un chevauchement non négligeable entre les pics de Thia + esters-P et celui du chlore ; cette méthode, par ailleurs relativement longue, n'a pas été retenue.

Ces considérations justifient l'établissement des courbes standards avec des échantillons dilués dans le TCA salin ; ceci équivaut à introduire un facteur correctif tenant compte des pertes réalisées sur les extraits tissulaires lors de l'électrophorèse.

FIG. II.1. 4.

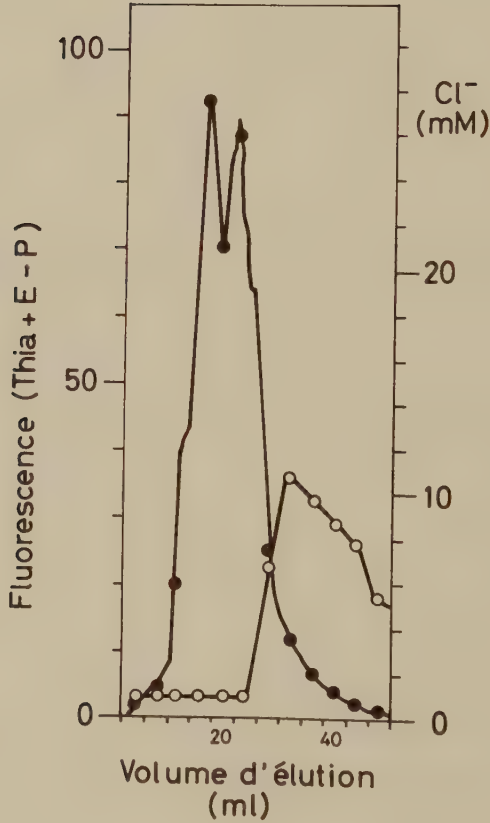


Figure II.1.4 : Dessalage d'un mélange standard (Thia + esters-P, à 100 $\mu\text{g/ml}$ TCA salin) sur colonne Bio-Rad Ag 11A8 (60 x 1 cm). 2 ml d'échantillon sont appliqués ; élution avec H_2O b.d. à 0,3 ml/min. Le dosage du chlore est effectué par précipitation à l' AgNO_3 ; le dosage des thiamines est effectué par fluorescence. ● Thia + Esters-P ; ○ Cl^- .

B. En présence de tissu : Lors de l'extraction, des pertes peuvent se produire par adsorption sur le précipité de protéines ou encore lors des lavages à l'éther. De même la molécule de thiamine peut subir des altérations en présence de certains composés du tissu (Ågren, G., 1946 ; Hasegawa et coll., 1957 ; Matsukawa et Yurugi, 1953) ; ces possibilités sont testées en ajoutant aux fragments de tissu des quantités différentes d'un mélange standard en solution aqueuse, juste avant l'extraction au TCA ; les récupérations sont calculées d'après les nmoles/ml d'extrait que l'on retrouve pour chaque standard (Tableau II.1.2). Les contributions de la thiamine et esters-P provenant de l'extrait ne sont pas déduites ; malgré cela les récupérations sont inférieures à 100 %, quelle que soit la quantité de standard ajoutée. Un éventuel dosage des échantillons inconnus par incorporation de standards internes s'avérerait donc inadéquat. Dans ce test, la récupération moyenne se situe entre 75 et 87 % pour la Thia, la TMP et la TPP alors qu'elle n'atteint que 50 % pour la TTP ; les taux de thiamine et esters déterminés dans les extraits seront donc sous-estimés, surtout en ce qui concerne la TTP. Plusieurs extractions successives du culot de protéines n'ont pas amélioré les rendements ; il se pourrait qu'une perte importante ait lieu lors des lavages à l'éther. En effet, un "bouchon" gélatineux se forme à l'interface entre les phases aqueuse et éther ; nous l'avons attribué à la présence massive de mucopolysaccharides provenant de l'organe électrique ; une adsorption importante des composés, et surtout de la TTP, pourrait avoir lieu à ce niveau. Or, le lavage à l'éther s'avère indispensable parce que, en augmentant le pH, il améliore la migration électrophorétique et évite une hydrolyse importante des esters-P et de l'ACh. Par

TABLEAU 11.1.2

COMPOSANTE	NMOLES AJOUTEES PAR ML D'EXTRAIT	NMOLES RETROUVEES PAR ML D'EXTRAIT	RECUPERATION (%)
ThIA	13,1 ●	10,3	78
TMP	13,1	8,3	63
TPP	11,2	10,7	96
TTP	13,1	5,9	45
ThIA	742 ✕	606	82
TMP	600	496	83
TPP	504	427	85
TTP	487	230	47
ThIA	1484 ▲	900	61
TMP	1200	1356	113
TPP	1080	864	80
TTP	974	558	57

Récupérations calculées après adjonction de différents volumes d'un mélange standard concentré (1 mg/ml), juste avant l'extraction par le TCA 5 % ; ● les quantités ajoutées sont environ égales à celles présentes dans l'extrait tissulaire ; ✕ et ▲ : les quantités sont de 10 et 15 fois supérieures à celles des extraits, respectivement ; dans ces deux cas, 10 µl d'échantillon sont soumis à l'électrophorèse. La ThIA et ses esters provenant de l'extrait ne sont pas déduits.

adjonction de thiamine marquée (2-méthyl-¹⁴C-thiazole) avant l'extraction au TCA, une perte moyenne d'environ 20 % a pu être attribuée au lavage à l'éther ; cette valeur est toutefois très sujette à des variations.

4. Reproductibilité : La reproductibilité de la méthode est testée en soumettant les mêmes échantillons à plusieurs électrophorèses et dosages séparés et en comparant les résultats. La loi statistique de Student-Fisher, ou test de t , permet d'estimer la probabilité p , significative d'une bonne reproductibilité, lorsque sa valeur est inférieure ou égale à 5 %.

A. Test avec les standards : La reproductibilité de la réaction d'oxydation pourrait être entravée par plusieurs facteurs tels que présence de poussière, verrerie mal lavée, contaminants fluorescents. Des tests effectués sur chaque standard séparément, sans le soumettre à l'électrophorèse, montrent que ceci n'est pas le cas (Tableau II.1.3), la probabilité p étant inférieure à 0,1 %. De même, après l'électrophorèse des standards, la reproductibilité de la réaction reste très satisfaisante.

B. Test avec les extraits tissulaires : Lorsqu'un même extrait de Torpille est soumis à 4 électrophorèses parallèles, les résultats obtenus témoignent d'une reproductibilité peu satisfaisante (p est compris entre 10 et 20 %) ; l'incapacité de visualiser les spots de thiamine et esters de l'extrait peut en partie expliquer cette variabilité. Par contre, lorsque différents extraits

TABLEAU II.1.3

INTENSITE DE LA FLUORESCENCE (Q) UNITES ARBITRAIRES				
	T _{HIA}	TPM	TPP	TTP
	73,5	47	60	56
	79,5	49	62	56
	75,5	52,5	58	55
	80	47	63,5	56
	80	50	60	54
	82	51	59	49
MOYENNE ET ECART TYPE	78,4 ± 1,31	49,4 ± 0,9	60,4 ± 2	54,3 ± 2,7
P	<0,1 %	<0,1 %	<0,1 %	<0,1 %

Reproductibilité de la réaction d'oxydation donnant lieu à la fluorescence ; 20 µl de chaque solution de standard à 100 µg/ml H₂O b.d. sont ajoutés à 3,5 ml du réactif d'oxydation ; après 2 min, la réaction est stoppée par 0,5 ml de H₂O₂ en solution dans du méthanol 50 % ; la probabilité p est significative quand ≤ à 5 %.

d'une même Torpille sont dosés (Tableau II.1.4) la reproductibilité semble améliorée ; p , en moyenne, a diminué entre 5 et 10 % ; l'extraction au TCA n'introduit donc pas un facteur de variabilité supplémentaire à celui déjà produit par l'électrophorèse. En conclusion, dans toute expérience, chaque taux de thiamine et esters doit s'estimer à partir d'au moins 3 fragments de tissu. Le tableau II.1.4 montre également que les taux moyens déterminés chez différents animaux sont assez proches, sauf pour la TTP qui présente de grandes variations ; les écarts types, calculés pour chaque composé, sont assez différents d'une Torpille à une autre ; des facteurs inhérents à chaque animal peuvent considérablement influencer la reproductibilité de la méthode.

Lorsque les taux de thiamine et de chaque ester sont exprimés en pourcent du total Thiamine + esters trouvés dans chaque extrait, les fluctuations diminuent considérablement. Le tableau II.1.5 montre les valeurs ainsi calculées, chez 3 Torpilles ; nous pouvons remarquer que, quel que soit le taux de thiamine totale l'importance relative de chaque composante à l'intérieur de ce total paraît assez constante d'une Torpille à une autre. Au cours de ce travail les taux seront le plus fréquemment indiqués sous cette forme.

5. Dosage de l'ACH : L'ACH totale est dosée parallèlement aux thiamines, dans les mêmes échantillons. Deux méthodes de dosage sont indifféremment appliquées, soit par bioessai, sur le muscle

TABLEAU II.1.4

TORPILLES	NMOLES/G : MOYENNES ET ECARTS TYPES			
	THIA	TMP	TPP	TTP
1 (N = 5)	33,5 ± 6,5 P < 5 %	53 ± 6 P < 2 %	13,5 ± 0,6 P < 0,1 %	66,5 ± 6,5 P < 1 %
2 (N = 6)	31,1 ± 9,2 P < 10 %	41,6 ± 13,9 P < 10 %	13 ± 9,4 P < 30 %	89 ± 46 P < 20 %
3 (N = 4)	32,3 ± 10,6 P < 10 %	43,9 ± 20,5 P < 20 %	22,3 ± 3,9 P < 2 %	42,1 ± 21,5 P < 20 %

Reproductibilité de la méthode testée sur les extraits de tissu ; plusieurs extraits (N) sont testés par Torpille. Sur l'électrophorégramme les spots de chaque composé sont repérés d'après ceux de standards concentrés, soumis à la même électrophorèse que les échantillons.

TABLEAU II.1.1.5

TORPILLES	% DU TOTAL THIA + ESTERS-P : MOYENNES ET ECARTS-TYPES			
	THIA	TMP	TPP	THP
1 (N = 5)	26,6 ± 4,6 P < 1 %	26,8 ± 2,2 P < 0,1 %	14,5 ± 3,1 P = 5 %	32,1 ± 3 P < 0,1 %
2 (N = 6)	31,3 ± 1,8 P < 0,1 %	25,3 ± 3,7 P < 1 %	2,9 ± 1,3 P < 10 %	40,5 ± 4,1 P < 0,1 %
3 (N = 4)	37,6 ± 7,5 P < 5 %	22 ± 4,9 P < 5 %	5 ± 1,7 P < 10 %	35,7 ± 6,8 P < 5 %

Le taux de thiamine et de chaque ester est exprimé en % du total Thia + esters-P, trouvé dans chaque extrait ; N, nombre d'extraits dosés pour chaque Torpille ; la reproductibilité est estimée par la valeur de p.

abdominis de grenouille (*Rana esculenta*) (MacIntosh et Perry, 1950), soit par un dosage radiochimique faisant appel à l'hydrolyse par l'acétylcholinestérase (AChE) (Dunant et Hirt, 1976). L'ACh "liée", c'est-à-dire vésiculaire, est déterminée après homogénéisation du tissu dans le tampon Torpille ; après 2 min une solution à 50 % (p/v) de TCA est ajoutée, à raison de 1 volume pour 10 volumes d'homogénat ; l'ACh dite "libre" ou cytoplasmique, qui, dans ces conditions est très rapidement hydrolysée par l'AChE du tissu, se mesure par différence entre l'ACh totale et l'ACh "liée".

RESULTATS

La teneur en thiamine totale (Thia + esters-P) de l'organe électrique de Torpille atteint en moyenne 120 ± 24 nmoles/g de poids humide ($N = 17$). La répartition de la thiamine et esters dans le tissu frais, non stimulé, est la suivante : $31,8 \% \pm 2,6$ de thiamine, $21,9 \% \pm 2,4$ pour la TMP, $8,4 \% \pm 1,9$ pour la TPP et $37,9 \% \pm 3$ % pour la TTP. Comparativement, le contenu en ACh totale du tissu est de 590 ± 77 nmoles/g, dont les 40 à 50 % sont représentés par l'ACh "liée" ou vésiculaire. Comme nous l'avons démontré dans "Matériel et Méthodes", le taux de thiamine et esters sont probablement sous-estimés. Si un facteur correctif est introduit pour chaque composé (environ 1,3 pour la thiamine, 1,2 pour la TMP et la TPP, 2 pour la TTP) la teneur en thiamine totale de l'organe électrique s'élèvera

à 250 nmoles/g ; ce taux équivaldrait approximativement à la moitié de l'ACh totale, c'est-à-dire à de l'ACh libre ou de l'ACh liée.

Dans la recherche d'une relation possible entre le transmetteur et la thiamine, nous avons effectué des tests de corrélation sur 17 Torpilles. Aucune relation significative n'a pu être établie entre les taux d'ACh totale et de thiamine totale ; de même aucune composante, Thiamine ou ester (exprimée en nmoles/g ou en %) paraît varier individuellement en fonction du taux d'ACh "libre" ou "liée". Dans ce collectif, l'ACh totale, tout comme la thiamine totale, ne semblent pas reliées à la taille des Torpilles.

Par contre, lorsque les résultats sont analysés en fonction des saisons, des variations significatives se dégagent (Figure II.1.5) ; en effet, le rapport du taux global d'esters-P et de la thiamine est plus bas en été qu'au printemps et surtout qu'en hiver. En ce qui concerne l'ACh, le rapport liée/libre semble varier dans le même sens, à savoir qu'il est inférieur en été (0,97) par rapport au printemps ou à l'hiver (2,11 et 4,4 respectivement). Le tableau II.1.6 montre que les taux de thiamine et d'ACh liée se maintiennent dans un rapport sensiblement égal (0,1), quelle que soit la saison ; par contre le rapport de la thiamine phosphorylée et de l'ACh libre varie considérablement au cours des saisons ; en été sa valeur est proche de 0,1, donc égale au rapport Thia/ACh liée ; au printemps et en hiver ce rapport augmente significativement pour tendre vers l'unité, c'est-à-dire autant d'ACh libre que d'esters-P.

En conclusion : des variations saisonnières du taux de thiamine phosphorylée ont très probablement lieu.

FIG. II. 1. 5.

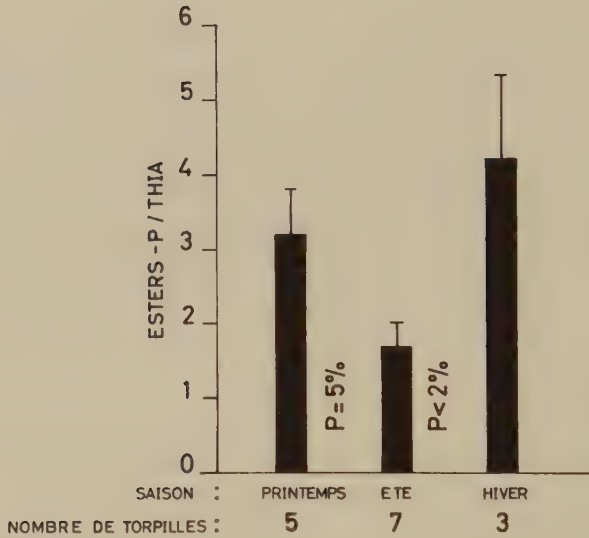


Figure II.1.5 : Variation du rapport esters-P / Thia, en fonction des saisons. Les valeurs au printemps ont été essentiellement déterminées pendant les mois de mars et de mai, celles de l'été, en juin, juillet et août ; celles d'hiver, en décembre et janvier. La séparation entre le printemps et l'été n'est donc pas très nette, ce qui expliquerait que la différence soit à la limite de la signification ($p = 5\%$). Les esters-P correspondent à la somme TMP + TPP + TTH en nmoles/g.

TABLEAU II.1.6

RELATION ENTRE LES TAUX DE THIAMINE ET D'ACH EN FONCTION DES SAISONS

	<u>ESTERS-P</u> ACH LIBRE	<u>THIA</u> ACH LIEE
	MOYENNES ET ECARTS REDUITS	
PRINTEMPS (N = 5)	0,71 ± 0,25	0,1 ± 0,01
P	< 5 %	NON SIGNIFICATIF
ETE (N = 7)	0,12 ± 0,049	0,09 ± 0,018
P	= 5 %	NON SIGNIFICATIF
HIVER (N = 3)	1,35 ± 0,8	0,08 ± 0,037

Les taux de Thia et esters-P, pour chaque Torpille, sont des moyennes de 2 ou 3 extraits. L'ACH totale est dosée dans les mêmes extraits. L'ACH "liée" est dosée dans les homogénats correspondants ; l'ACH "libre" est calculée par différence entre l'ACH totale et l'ACH "liée", comme indiqué dans "Matériel et Méthodes". Lorsque la différence est significative, p est ≤ à 5 % (test de t).

Toutefois pour les préciser, il faudrait disposer d'un collectif plus important, s'étendant sur plusieurs années. Nos résultats laissent supposer qu'en hiver, la majeure partie de la vitamine se trouve sous forme phosphorylée et que le taux d'ACh "libre" est bas. Une relation possible entre l'ACh et la thiamine sera considérée et discutée plus loin, lors d'une hypothèse générale sur le rôle de la thiamine dans le fonctionnement du tissu nerveux.

II.2. HISTOFLUORESCENCE DE LA THIAMINE DANS L'ORGANE ELECTRIQUE

MATERIEL ET METHODES

PROCEDE.

Histofluorescence sur des fragments isolés d'électroplaque :

Des tranches d'organe, d'environ 5 g, sont finement émincées au moyen de deux scalpels. Au moment où la structure macroscopique est totalement détruite, le hâchis est mis en suspension dans 50 ml de fixateur composé d'une solution à 0,8 % (p/v) de NaCl dans du formol à 20 % (v/v) neutralisé. La suspension, après agitation magnétique pendant 30 min, à température ambiante, est passée à travers une grille métallique, à trame carrée (1 x 1 mm) (Morel et al., 1977) ; le filtrat ainsi obtenu est centrifugé pendant 20 min à 10'000 x g ; le culot est débarrassé du fixateur restant par plusieurs lavages à l'eau, puis remis en suspension dans 5 ml du réactif d'oxydation suivant : 0,08 % $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$, NaOH 2,45 % dissous dans de l'éthanol à 50 % (v/v). Après incubation pendant 45 min à 40-50°C, la réaction est arrêtée par deux centrifugations successives dans 10 ml d'éthanol 40 % (v/v). Une suspension constituée d'environ 25 mg de tissu initial dans de l'éthanol à 40 % est sédimentée sur une lamelle de verre ronde, par centrifugation horizontale à 3'000 x g, pendant 20 min (Centrifugeuse Christ Heraeus, 11 Ks) ; le matériel déposé sur la lamelle est recouvert d'une goutte d'un

milieu de contraste, miscible à l'eau (W15, n_D 1,515 de C. Zeiss) et le tout est monté sur une lame porte-objet.

Histofluorescence sur des coupes d'organe électrique :

Des fragments de tissu d'environ 1 x 0,5 x 0,2 cm sont fixés dans le formol salé, pendant 24 heures à température ambiante ; après élimination du fixateur par lavage sous eau courante, pendant plusieurs heures, les pièces sont déshydratées par incubations successives dans différentes gradations d'éthanol (70 %, 90 %, 95 %, 100 %) ; après clarification dans du toluène, l'enrobage à la paraffine s'effectue à 62°C. Des coupes sériées de 5 microns d'épaisseur orientées transversalement aux électroplaques (c.à d. longitudinalement aux prismes) sont collées au moyen d'albumine, à 60°C, sur des lames porte-objet. L'adhésion des coupes sur le verre a été améliorée en traitant préalablement les lames avec une solution aqueuse de $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$ 0,2 %, NaOH 1M. La réaction produisant la fluorescence s'obtient comme ci-dessus, après dissolution de la paraffine par du xylol ; l'excès de réactif est éliminé, après incubation, par lavage à l'éthanol 40 %. Les préparations sont ensuite montées sur des lames porte-objet, après adjonction du milieu de contraste.

Avec ces 2 types de préparation, les contrôles sont obtenus en traitant le tissu de manière identique aux tests, mais en omettant le ferricyanure de K dans le milieu réactionnel.

Autres techniques :

D'autres fixateurs ont été testés, tels que glutaraldéhyde

à 2,5 % (v/v) en tampon phosphate, pH 7,4, ou le fixateur de Carnoy (60 ml éthanol absolu, 30 ml chloroforme, 10 ml acide acétique). Dans ces deux cas, la fluorescence n'apparaît pas. Nous avons également tenté un enrobage à la paraffine, sous vide, le tissu non fixé étant préalablement soumis à une cryodessiccation. Cette technique s'est avérée inadéquate, en raison de la forte teneur en eau de l'organe électrique (92 %). La réaction fluorescente produite en oxydant la thiamine au moyen de vapeurs de bromure de cyanogène (CNBr) et de NH_4OH concentré, a été testée sur coupes selon la méthode décrite par Tanaka et Cooper (1968).

MATERIEL.

Microscopie de fluorescence :

Un microscope Zeiss Ultraphot, muni d'un condenseur à épifluorescence III RS est utilisé. La source lumineuse est une lampe à vapeurs de Hg, à haute pression (HBO 200). Les micrographies en fluorescence sont prises sur un film GAF 500 ASA, les temps d'exposition variant entre 1 et 3 minutes. Les micrographies en contraste de phase et en contraste interférentiel s'effectuent sur un film Agfapan 25. L'identification spectrofluorimétrique du thiochrome dans le tissu, ainsi que l'analyse des coupes fluorescentes par balayage sont faites sur un microspectrofluorimètre Zeiss MPM 01K, la source lumineuse étant une lampe à Hg, à haute pression, HBO 100 ; l'appareil est équipé avec un condenseur à épifluorescence modifié, II/F1 ; les filtres d'excitation consistent en une combinaison d'un filtre Schott UG1, 3 mm et d'un filtre BG 38,

2 mm ; les analyses spectrales sont obtenues avec un filtre interférentiel continu (Schott) de 410 à 600 nm.

Pour le balayage à faible résolution, une ouverture circulaire de 25 μm est choisie, la vitesse de balayage étant de 145,5 $\mu\text{m}/\text{min}$; une plus haute résolution est rendue possible par l'emploi d'une ouverture rectangulaire plus petite (4,8 x 2,4 μm) et une vitesse de 35 $\mu\text{m}/\text{min}$. La spécificité de la fluorescence se détermine par comparaison avec un système standard préparé comme suit : une goutte d'un mélange contenant du thiochrome de thiamine à 10^{-5} M, ainsi que de l'albumine de bœuf à 1 %, en solution dans de l'éthanol à 40 %, est déposée sur une lame porte-objet ; une fois celle-ci séchée, l'analyse spectrale se fait de manière identique à celle appliquée aux coupes du tissu.

Microscopie électronique :

Des blocs de tissu fixés au glutaraldéhyde (à 2 % en tampon phosphate, pH 7,4) sont post-fixés par du OsO_4 , déshydratés dans des solutions d'éthanol de gradations croissantes et enrobés dans de l'EPON 812. Des coupes fines d'organe électrique sont observées dans un microscope électronique Philips EM30, après coloration au citrate de Pb.

Toute cette partie du travail a pu être effectuée grâce à la collaboration de l'Institut d'Histologie de Genève.

RESULTATS

Dans les fragments isolés, une intense fluorescence bleue-violette, caractéristique du thiochrome, se développe en prédominance dans les fibres nerveuses et leurs ramifications (Figures II.2.1 - II.2.3) ; dans les fibres myélinisées la fluorescence ne se restreint pas aux segments myélinisés, mais reste également très visible aux nœuds de Ranvier (Figure II.2.3) ; ainsi, la thiamine semble se localiser à la fois dans la myéline et dans l'axoplasme, du moins au nœud de Ranvier. Sur les figures II.2.1 et II.2.2, la fluorescence révèle également les fibres préterminales, non myélinisées, qui, dans l'organe électrique, présentent des ramifications caractéristiques en "bois de cerf" (Ranvier 1978).

Comme le montre la micrographie au microscope électronique (Figure II.2.6), les terminaisons nerveuses bordant la face ventrale de l'électroplaque sont contiguës ; les limites de résolution de la microscopie optique ne rendent pas possible une distinction entre elles ; sur des vues frontales de l'électroplaque (Figures II.2.2 et II.2.3) les terminaisons nerveuses pourraient correspondre aux zones de fluorescence diffuse ; ces régions, observées en contraste de phase ou en contraste interférentiel de Zeiss Nomarski, sont composées d'un matériel finement granuleux (cf. aussi Morel et coll., 1977). Cette fluorescence caractéristique se développe également dans les noyaux de diverses cellules, spécialement des cellules de Schwann, situées aux points de ramification des axones. Ces observations sur des fragments isolés sont justifiées par celles faites sur des coupes transversales

d'électroplaques, où la fluorescence bleue-violette apparaît dans les faisceaux nerveux passant entre 2 prismes. Sur ces coupes, les vues les plus intéressantes se situent au cœur des prismes, où les électroplaques atteignent leur épaisseur maximale ; la fluorescence du thiochrome y révèle clairement l'architecture périodique de ce tissu (Figure II.2.11). Deux bandes majeures de fluorescence sont visibles : une étroite et intense, du côté ventral de l'électroplaque, l'autre, plus large, présente une fluorescence beaucoup plus diffuse ; ces régions alternent avec des zones non fluorescentes (Figures II.2.5 et II.2.10).

En contraste de phase, la largeur des 2 bandes équivaut environ à celle de l'électroplaque, les zones non fluorescentes correspondant aux espaces extracellulaires entre les plaques. La microscopie électronique (Figure II.2.6) montre que la face ventrale de l'électroplaque est entièrement recouverte par des terminaisons nerveuses, qui, en microscopie de fluorescence correspondent aux fines bandes intensément fluorescentes (Figure II.2.5).

Dans toutes les préparations témoins, où le $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$ a été omis et où la thiamine est détruite par le traitement à la soude caustique, la fluorescence est si faible que l'architecture du tissu n'est plus discernée ; de plus, sur les préparations non traitées, l'autofluorescence est pratiquement inexistante. La présence du $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$ est donc essentielle pour produire la réaction fluorescente.

ANALYSE SPECTRALE SUR LES COUPES DE TISSU.

Les courbes d'émission s'obtiennent avec un filtre d'excitation ayant un maximum à 352 nm. Les caractéristiques

spectrales trouvées sur les coupes sont identiques à celles du système standard ; ainsi que le montre la figure II.2.7, le pic d'émission se situe autour de 450 nm ; il faut rappeler que la thiamine et ses différents esters phosphoriques donnent des spectres de fluorescence identiques.

La molécule de thiamine peut également s'oxyder en thiochrome par traitement au CNBr, en présence des vapeurs alcalines de NH_4OH concentré ; le spectre du thiochrome ainsi formé paraît assez différent de celui obtenu avec le $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$ (Figure II.2.12) ; le premier pic à 460 nm, pourrait être dû à la présence de nicotinamide ou de dérivés, qui réagissent également avec le CNBr pour donner un produit fluorescent à 460 nm (Tanaka et Cooper, 1968). Quel que soit le réactif d'oxydation employé, CNBr ou $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$, la réaction doit avoir lieu en milieu alcalin ; or, le NADH ou le NADPH sont connus pour présenter une fluorescence à pH 8 (voir "Practical Fluorescence", 1977). Afin de s'assurer de la spécificité de la fluorescence obtenue, des solutions de NADH et NADPH, à 10^{-5} M, sont traitées par le $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$ alcalin (pH 11) ; aux longueurs d'ondes caractéristiques du thiochrome les 2 composés ne fluorescent pratiquement pas ; nous pouvons donc conclure qu'aucun dérivé de la nicotinamide n'intervient dans la fluorescence observée sur coupe histologique.

FLUORESCENCE OBSERVEE PAR BALAYAGE.

Ce type d'analyse permet une approche plus quantitative du problème. Les coupes transversales aux électroplaques sont analysées ; à relativement faible résolution (vitesse rapide

Figure II.2.1 : Fluorescence dans une vue frontale d'un fragment isolé d'organe électrique. La fluorescence souligne clairement les ramifications caractéristiques des fibres préterminales (pf) qui sont non myélinisées. x 540.

Figure II.2.2 : Vue frontale d'un même type de préparation. La fluorescence apparaît dans les fibres nerveuses et leurs ramifications préterminales (pf). Les noyaux des cellules de Schwann (sn) fluorescent également. Ils se distinguent nettement sur les photos en contraste de phase de cette même préparation ; ils se localisent le plus fréquemment aux points de ramification des fibres nerveuses (voir Ranvier, 1878). x 580.

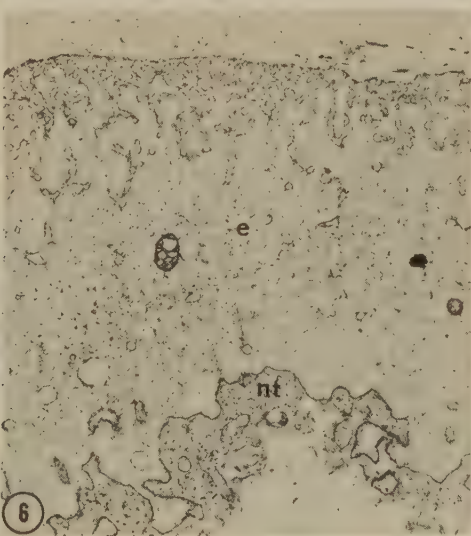
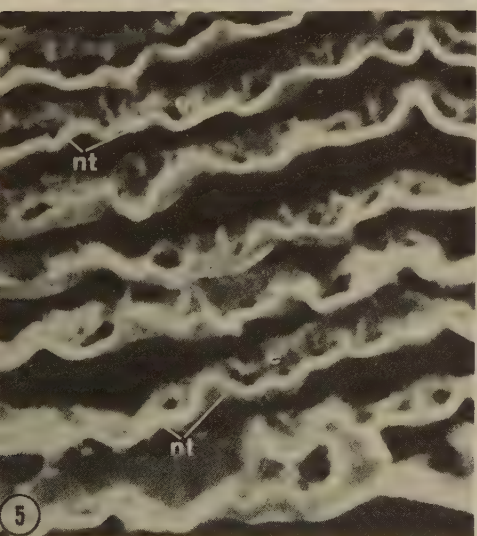
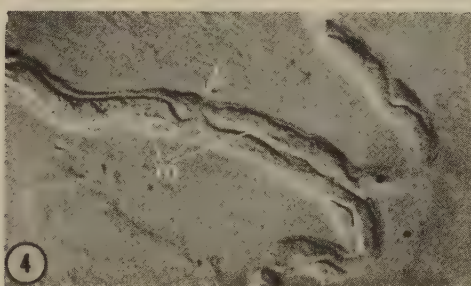
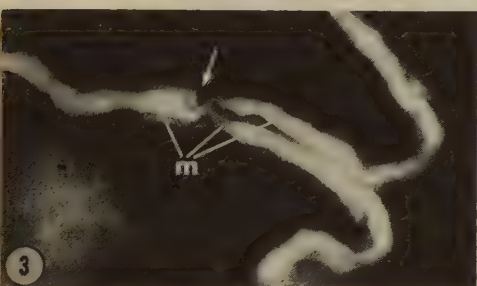
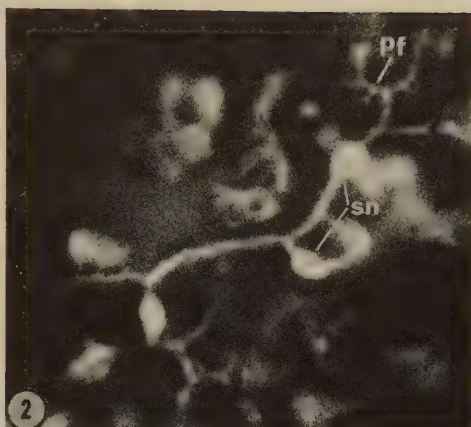
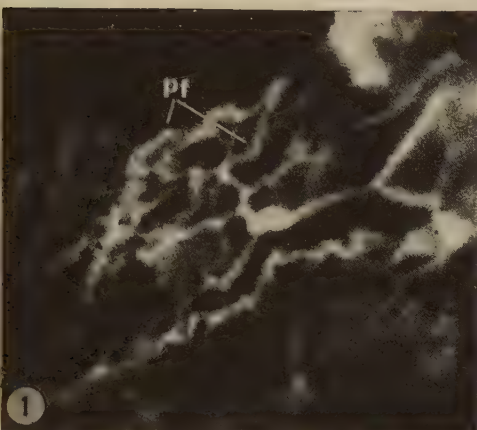
Figure II.2.3 : Fluorescence d'une fibre nerveuse myélinisée dans une préparation de fragment isolé de tissu. La fluorescence du thiochrome s'observe dans le segment myélinisé (m) ; elle est moins intense mais non interrompue au nœud de Ranvier (flèche). La fluorescence est beaucoup plus faible dans le cytoplasme de la cellule de Schwann entourant les fibres nerveuses. x 580.

Figure II.2.4 : Même préparation que sur la figure II.2.3, mais photographiée en contraste interférentiel de Zeiss Nomarski. x 580.

Figure II.2.5 : Coupe longitudinale à travers un prisme, c'est-à-dire transversale aux électroplaques ; la partie supérieure de la photo correspond au côté dorsal de l'organe électrique, la partie inférieure au côté ventral. Les terminaisons nerveuses (nt) recouvrant la face ventrale des électroplaques (e) apparaissent sous forme de fines bandes continues de matériel extrêmement fluorescent ; la fluorescence de la cellule de l'électroplaque est beaucoup plus faible. x 690.

Figure II.2.6 : Micrographie électronique d'une électroplaque orientée comme celles de la figure II.2.5. La face ventrale de l'électroplaque est recouverte par des terminaisons nerveuses très contiguës (nt), qui ne peuvent être résolues individuellement par la microscopie optique. Seul un très petit nombre de mitochondries et d'autres organelles sont présentes dans le cytoplasme de l'électroplaque. x 5'500.

FIG. II. 2. 1—6



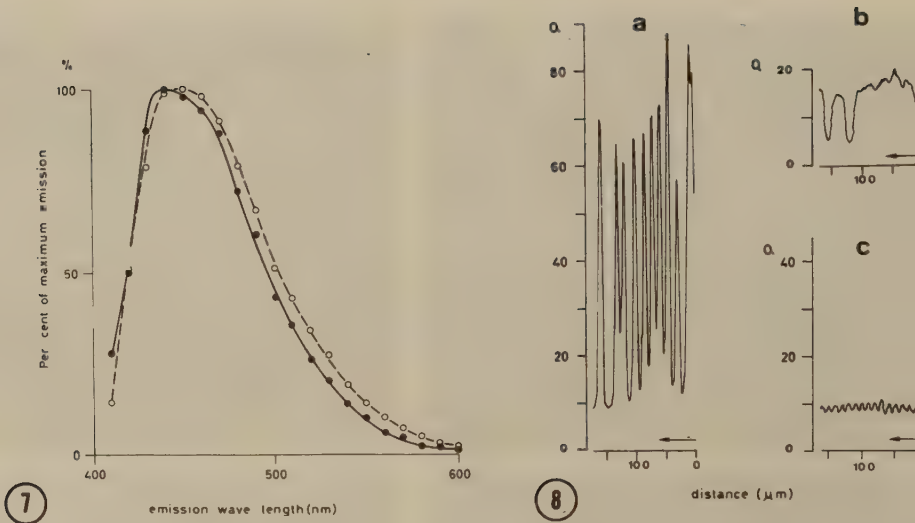
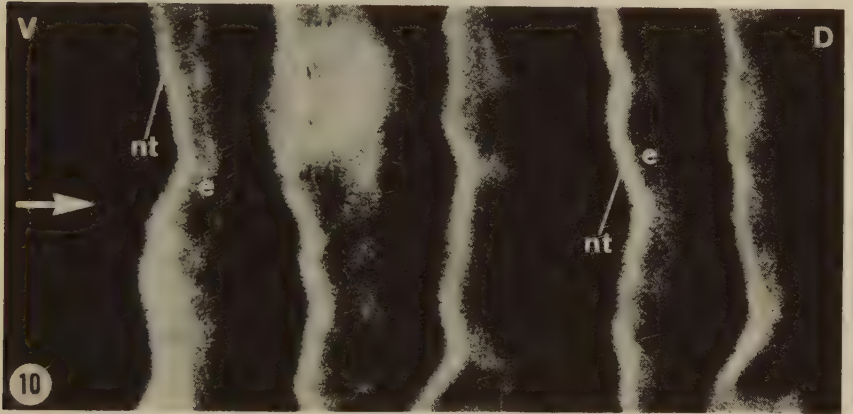
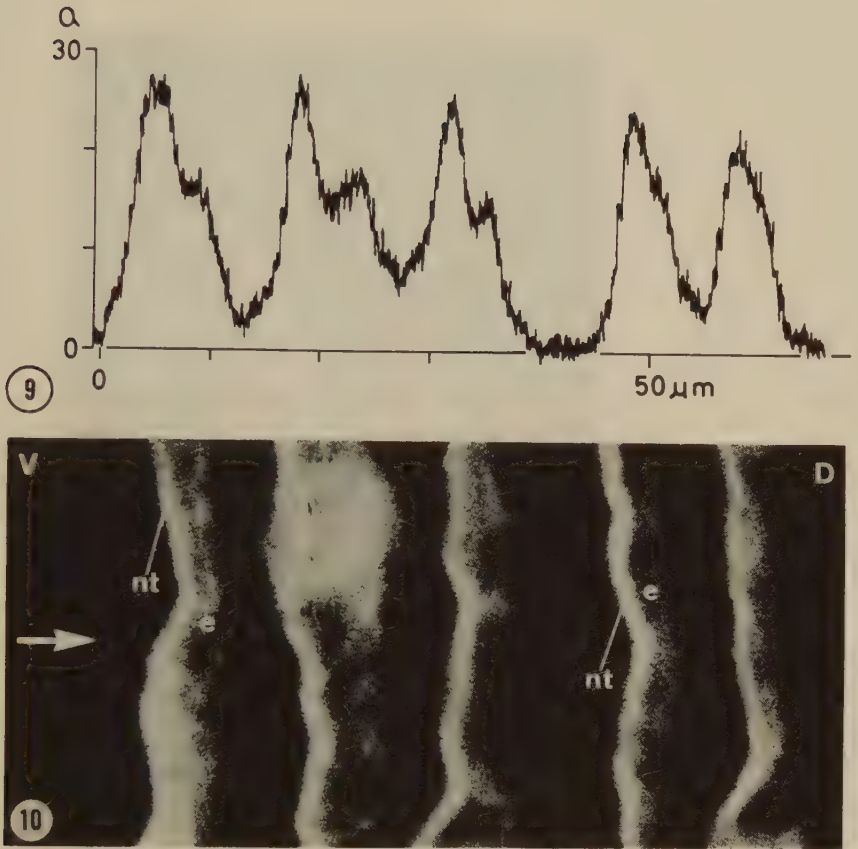
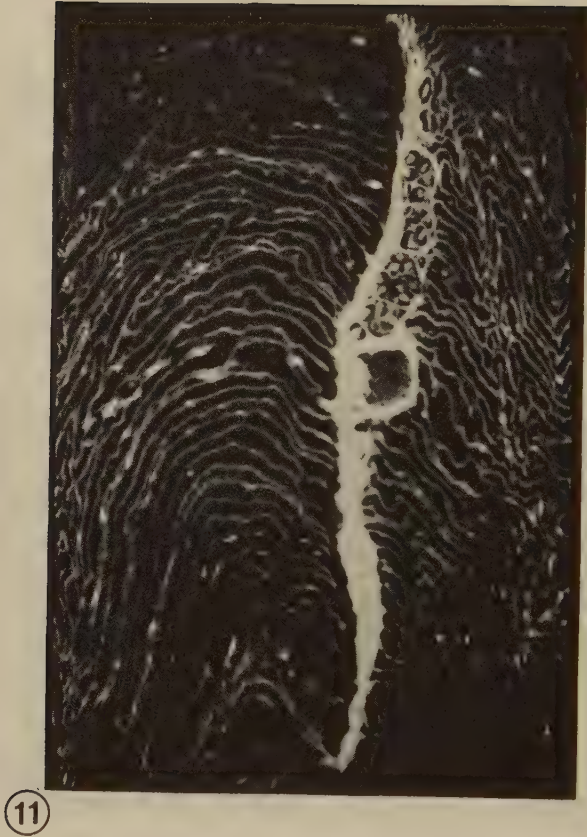


Figure II.2.7 : Spectre d'émission du thiochrome déterminé dans les préparations histologiques (trait pointillé) et dans un système standard constitué d'un mélange de thiochrome et d'albumine d'œuf (trait continu). Le filtre d'excitation a un maximum à 352 nm.

Figure II.2.8 : Analyse par balayage avec une faible résolution ; intensité de la fluorescence (Q) en fonction de la distance balayée. (a) enregistrement effectué sur une coupe fluorescente du tissu ; (b) enregistrement effectué sur une coupe adjacente témoin traitée avec une solution de NaOH 0,61 M ; (c) courbe de calibration servant à la détermination de la vitesse de balayage qui est ici de 145,5 $\mu\text{m}/\text{min}$; la distance balayée est de 160 μm . Le balayage se fait dans la direction ventro-dorsale du prisme.



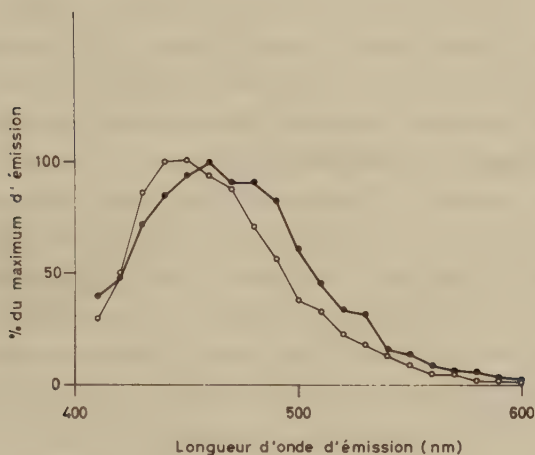
Figures II.2.9 et 10 : Analyse par balayage avec une haute résolution. La région balayée est montrée sur la figure II.2.10 ; la flèche indique la zone où est passé le spot de lumière excitatrice ; la largeur du pic de plus forte intensité, sur le graphique, est égale à celle des bandes très fluorescentes correspondant aux terminaisons nerveuses (nt) ; les épaulements de moins grande intensité ont une largeur égale à celle des électroplaques elles-mêmes (e). Le balayage est effectué dans le sens ventro-dorsal du prisme. La vitesse de balayage est de $35 \mu\text{m}/\text{min}$ et la distance balayée de $160 \mu\text{m}$; seuls les premiers $66 \mu\text{m}$ balayés sont représentés ici. $\times 1'380$.



11

Figure II.2.11 : Fluorescence dans une coupe transversale d'organe électrique de bébé Torpille. La fluorescence du thiochrome révèle clairement l'architecture périodique de ce tissu. Le faisceau nerveux passant entre deux prismes présente une intense fluorescence. x 270.

FIG II. 2. 12.



12

Figure II.2.12 : Spectres d'émission du thiochrome déterminés sur des coupes transversales d'organe électrique. Dans un des cas, la fluorescence est développée en traitant la coupe par des vapeurs de CNBr , selon la technique de Tanaka et Cooper (●) ; le spectre d'émission du thiochrome obtenu par traitement des coupes avec le $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$ paraît différent (○). Le filtre d'excitation a un maximum de 352 nm, dans les deux cas.

de balayage et ouverture circulaire de 25 μ m) l'alternance périodique des zones fluorescentes et non fluorescentes est mise en évidence ; une coupe témoin, adjacente à celle fluorescente, présente une intensité 5 fois inférieure (Fig.II.2.10). A plus haute résolution (faible vitesse de balayage et petite ouverture rectangulaire) il est possible de démontrer quantitativement comment se distribue l'intensité de la fluorescence ; le balayage est effectué dans le sens ventro-dorsal du prisme ; le profil enregistré est le suivant : 1) un pic abrupt de forte intensité, dont la largeur correspond à celle de l'ensemble des terminaisons nerveuses sur la face ventrale ; 2) un épaulement de plus faible intensité, de largeur semblable à celle de l'électroplaque elle-même ; 3) une région non fluorescente entre les plaques. Ce schéma se répète tout au long de la distance balayée (Fig.II.2.9 et II.2.11).

HISTOFLUORESCENCE SUR COUPES D'AUTRES TISSUS.

Cette technique histofluorescente permet-elle de détecter des différences du contenu en thiamine entre diverses structures, lorsqu'un tissu est soumis à des conditions physiologiques ou pathologiques variées ? Pour essayer de répondre à cette question, d'autres tissus ont été traités par cette méthode ; nous avons utilisé des préparations neuromusculaires (nerf phrénique-diaphragme) ainsi que l'iris et le ganglion sympathique de rat ; chez la Torpille, le lobe électrique, le cerveau ainsi que le foie ont été également analysés. Dans toutes ces préparations, presque toutes les structures ont développé

une importante fluorescence bleue-violette sans différence significative d'intensité. Toutefois, il se pourrait que des concentrations plus élevées de $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$ permettent d'obtenir une telle distinction (Araki et Chin, 1956).

En conclusion, plusieurs évidences indiquent que la thiamine et ses esters phosphoriques sont la source de la fluorescence obtenue avec le $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$:

1. la courbe d'émission enregistrée sur les coupes de tissu correspond à celle du thiochrome standard.
2. La fluorescence du thiochrome est détruite par exposition prolongée aux U.V. (Burch et coll., 1952) ; or, durant le balayage des coupes nous avons pu observer une diminution de 40 % dans l'intensité de la fluorescence, après 10 min d'exposition à la lumière excitatrice ; une diminution du même ordre s'observe lorsque le thiochrome formé en éprouvette est irradié.
3. Le traitement prolongé des préparations histologiques par du NaOH, à 40-50°C, empêche tout développement ultérieur de fluorescence par le $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$; cet effet s'obtient aussi bien sur la thiamine standard en solution qu'avec des extraits tissulaires.

Quelle est la signification des résultats obtenus ?

La fluorescence bleue-violette du thiochrome a été clairement identifiée dans toute l'innervation de l'organe électrique ; elle est présente non seulement dans les segments myélinisés mais également aux nœuds de Ranvier et dans les fibres préterminales, non myélinisées. Von Muralt, en 1948, avec un procédé légèrement différent de celui décrit, n'a pu détecter de fluorescence au nœud de Ranvier. Au contraire, Araki et Chin (1956), en employant du $\text{FeK}_3(\text{CN})_6$ à 4 %, ont

mis en évidence une très forte fluorescence au nœud de Ranvier. Plus récemment, Tanaka et Cooper (1968), en traitant des coupes de nerf vague par des vapeurs de CNBr, ont remarqué l'apparition de fluorescence dans la myéline et les membranes, mais pas dans l'axoplasme. Ces résultats contradictoires sont difficilement explicables. Probablement les méthodes histologiques employées jouent un rôle important ; en effet, au cours du relativement long procédé histochimique, la thiamine peut être partiellement détruite, ou diffuser de l'axoplasme dans la gaine de myéline. Si la thiamine est présente en faible concentration dans un tissu, le thiochrome qu'elle forme peut être détruit par un excès de réactif. Toutefois, il existe plusieurs preuves de la présence de thiamine dans l'axoplasme. Nachmansohn et Steinbach (1942) ont identifié de la TPP dans l'axoplasme des axones géants de homard, bien que sa concentration soit nettement supérieure dans le feuillet périneural. En 1973, Tanaka et coll. constatent qu'un transport axoplasmique de thiamine a lieu dans le nerf sciatique de rat.

En conclusion : Dans l'organe électrique, la thiamine et ses esters-P sont très abondants et paraissent se localiser surtout dans les éléments nerveux, intensément fluorescents. La faible fluorescence observée dans l'électroplaque elle-même, peut sembler surprenante ; en effet, ces cellules dérivent de tissu musculaire, qui normalement détient une teneur assez élevée en vitamine. Toutefois, le cytoplasme des électroplaques est dépourvu de matériel contractile et présente une faible densité de mitochondries. Il serait donc compréhensible que son contenu en thiamine soit beaucoup plus faible que celui d'une fibre musculaire striée.

11.3. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DE L'ORGANE ELECTRIQUE.

PREPARATION DES SYNAPTOSOMES ISOLEES.

Principe.

La méthode employée est celle décrite par Israël et coll. (1976). Elle consiste à émincer aussi finement que possible des tranches d'organe électrique ; le hâchis, mis en suspension dans un grand volume de tampon physiologique, est d'abord forcé à travers 3 tamis métalliques à mailles décroissantes ; la dernière suspension obtenue est encore filtrée à travers une toile de nylon. Le filtrat final est centrifugé à basse vitesse et le culot resuspendu dans le tampon physiologique ; cette suspension est alors fractionnée sur gradient discontinu de sucrose-urée, en milieu isoosmotique. Après ultracentrifugation, les fractions sont collectées et analysées biochimiquement.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL.

- Les différents tamis métalliques, utilisés successivement, ont des mailles carrées de dimensions suivantes : 1000 μm , 500 μm et 200 μm ; ils ont été soudés à la flamme sur des seringues en plastique de 50 ml, dont la pointe a été coupée ; le piston des seringues permet de forcer les suspensions à travers les grilles.
- La toile de nylon utilisée pour l'obtention du dernier filtrat, présente une porosité de 50 μm .

- La centrifugation à basse vitesse s'effectue dans une centrifugeuse Sorvall SS 3, avec un rotor SS 34. L'ultracentrifugation se fait dans une ultracentrifugeuse Sorvall OTD 2, avec un rotor Beckmann SW 27.

Un microscope électronique JEM T7 a permis les contrôles morphologiques des différentes fractions.

Réactifs :

- Milieu physiologique Torpille, légèrement différent du précédent : NaCl , 280 mM ; KCl , 3 mM ; MgCl_2 , 1,2 mM ; CaCl_2 , 3,4 mM ; NaHCO_3 , 5 mM ; tampon phosphate de Na, 1,2 mM (pH 6,8) ; glucose, 5,5 mM ; urée, 300 mM ; sucrose, 100 mM ; après équilibration avec de l'oxycarbonate, le pH est de 7-7,2.
- Milieu physiologique Torpille sans sucrose et sans urée, servant à la préparation des solutions du gradient.
- Solutions pour le gradient discontinu : a) milieu physiologique Torpille 0,7 M sucrose, sans urée ; b) milieu physiologique 0,5 M sucrose, sans urée ; c) milieu physiologique 0,3 M sucrose, 0,1 M urée.

PROCEDE.

Des tranches minces d'organe électrique, au total 20 g, sont émincées au scalpel jusqu'au moment où la structure macroscopique du tissu n'est plus visible ; au cours de cette opération, un clivage se produit à travers le cytoplasme de l'électroplaque ; contrairement à tout autre type

d'homogénéisation, la face innervée de l'électroplaque reste intacte dans ces conditions (Morel, 1976). Le hâchis est agité (barreau magnétique) pendant 30 minutes dans 200 ml de tampon physiologique Torpille. Cette opération ainsi que toutes celles qui vont suivre se déroulent à 4°C. La suspension ainsi obtenue est forcée successivement à travers les 3 tamis métalliques de 1'000, 500 et 200 μm ; ce procédé permet de séparer les terminaisons nerveuses de la face ventrale de l'électroplaque. La dernière suspension obtenue est débarrassée des gros fragments membranaires restants, par filtration sur toile de nylon. Après avoir rincé la toile avec 50 ml de tampon physiologique nous obtenons un filtrat, F, qui contient la majorité des terminaisons nerveuses. Un bon nombre d'entre elles sont intactes, mais certaines, endommagées, ont libéré leur contenu cytoplasmique. Le filtrat est centrifugé à 6'000 x g pendant 20 minutes. Le surnageant représente la fraction "soluble" du filtrat ; il contient les éléments solubles du cytoplasme des électroplaques, des nerfs et des terminaisons nerveuses (vésicules synaptiques) ; sont également présents des fragments membranaires de faible densité (microsacs). Le culot, correspondant aux particules lourdes, est resuspendu dans 25 ml de tampon physiologique Torpille ; 6 ml de cette suspension (Ct) sont déposés sur un gradient discontinu de sucrose-urée, dont l'osmolarité est assurée par la salinité du tampon physiologique. Les gradients (3 ou 4 par expérience) sont alors soumis à une ultracentrifugation différentielle à 64'000 x g, pendant 40 minutes. L'aspect et la disposition des bandes du gradient sont représentés sur la figure II.3.1.

Du haut vers le bas du tube nous trouvons successivement une bande A, qui consiste en un surnageant clair, correspondant à la couche 0,1 M sucrose de l'échantillon appliqué ; une bande B, fine et bien délimitée, à l'interface entre 0,1 et 0,3 M sucrose ; une bande C, à l'interface entre 0,3 et 0,5 M sucrose, assez large et diffuse ; l'importance de la bande D, entre 0,5 et 0,7 M sucrose, varie d'une expérience à l'autre ; elle présente parfois un aspect floconneux ; le culot E est généralement assez important. Ces différentes fractions sont collectées depuis le haut du tube, au moyen d'une pompe péristaltique. Toutes les fractions correspondantes de plusieurs gradients sont réunies.

Dosages biochimiques :

Les échantillons sont analysés biochimiquement à chaque étape du fractionnement.

1. Dosages enzymatiques : un aliquot de 1 ml de chaque échantillon est dilué 2 fois dans une solution de Triton X-100, 1 % (v/v), et congelé. Un homogénat de tissu entier est extrait de manière identique. L'activité de la choline-acétyltransférase (CAT) est déterminée selon la technique de Fonnum (1975), celle de l'acétylcholinestérase (AChE), selon la méthode décrite par Dunant et Hirt (1976).
2. Dosage de l'ACh, Thiamines et Protéines : 2 ml de chaque échantillon, y compris un homogénat du tissu entier, sont extraits avec du TCA 5 % final. L'ACh et les thiamines sont dosées dans ces extraits par les techniques décrites précédemment (II.1). Après centrifugation des extraits TCA,

les culots de protéines sont dissous dans 2 ml de NaOH 1N (2 h à 50°C), et les protéines sont déterminées selon la méthode de Lowry et coll. (1951).

Calculs des récupérations en cours de fractionnement :

Pour chaque substance dosée, la récupération R_F par rapport au filtrat F, se calcule comme suit :

$$R_F = \frac{\text{Surn.} + \text{Culot}}{\text{Filtrat}} \times 100$$

De même, la récupération R_G , après l'ultracentrifugation de la suspension Ct sur gradient discontinu s'obtient par :

$$R_G = \frac{\text{"Total gradient"}}{\text{Culot}} \times 100$$

où le "Total gradient" constitue la somme des valeurs déterminées dans chaque fraction (A à E) et exprimées par gramme de tissu initial.

Contrôles morphologiques :

Dans certaines de nos expériences, les fractions récoltées sur le gradient sont observées au microscope électronique, par la technique de coloration négative. Pour ce, chaque fraction est préalablement fixée avec une solution faiblement concentrée de glutaraldéhyde (2 % final, v/v) ; une goutte de chaque suspension ainsi traitée est déposée sur une grille support de 200 meshs recouverte d'un double film mince de collodion + carbone. La coloration négative s'effectue avec

une solution de phosphotungstate de Na, 1 %, pH 7,2. Il faut noter que cette technique ne donne qu'une estimation qualitative du contenu de chaque fraction et ne permet aucune conclusion quant à la pureté de celle-ci. Elle présente toutefois l'avantage de permettre un contrôle morphologique rapide.

RESULTATS

Depuis leur isolement à partir du cerveau (Whittaker, 1959 ; De Robertis, 1961), les synaptosomes ont été largement utilisés pour l'étude, in vitro, du métabolisme présynaptique. Un nombre important de préparations existe (Jones, 1975), mais toutes proviennent de tissus contenant différents types de synapses et de neurotransmetteurs, ce qui complique fortement l'analyse biochimique et son interprétation. L'organe électrique de Torpille permet de détourner ces difficultés puisqu'il n'est constitué que de synapses cholinergiques. La méthode décrite par Israël et coll. (1976) a le double avantage d'être rapide et de fournir une préparation de synaptosomes hautement purifiés. En effet, la fraction C du gradient contient la majorité des synaptosomes ; son haut degré de pureté a été confirmé par des contrôles morphologiques au microscope électronique ; elle est pratiquement dépourvue de membranes post-synaptiques. Le diamètre moyen d'un synaptosome atteint environ 3 μ . L'activité spécifique de l'ACH, dans cette fraction, atteint 130 nmoles/mg de protéines, celle de la CAT, enzyme responsable de la synthèse du médiateur, étant

de 450 nmoles/h/mg de protéines. De plus, ces terminaisons nerveuses isolées sont stables pendant plusieurs heures et sont fonctionnelles puisqu'elles synthétisent et libèrent du transmetteur (Morel et coll., 1977).

Les expériences d'histofluorescence précédemment décrites indiquaient une forte concentration de thiamine dans les terminaisons nerveuses. Il s'avérerait donc intéressant de confirmer ces résultats en déterminant les taux de thiamine et esters-P dans des terminaisons nerveuses isolées. Les résultats obtenus proviennent de 7 Torpilles différentes.

ASPECT DES GRADIENTS ET CONTROLES MORPHOLOGIQUES.

Après ultracentrifugation, l'aspect et la disposition des bandes sur les gradients concordent généralement bien avec ceux rapportés par Israël et coll. (1976).

Les contrôles morphologiques des fractions du gradient ont été faits pour 3 expériences. Les résultats suivants sont obtenus : la bande A, correspondant à un surnageant clair, ne renferme aucune structure visible par la technique employée ; la bande B, contient généralement une faible proportion de synaptosomes ainsi que de nombreux petits fragments membranaires ; la bande C se montre assez abondante en synaptosomes et apparemment aucune autre structure n'est présente en fortes proportions. Le diamètre moyen d'un synaptosome, déterminé sur nos micrographies électroniques est proche de 1,5 à 2 μ (Figure II.3.2). La proportion de synaptosomes dans la bande D s'avère également assez importante. Le culot E est hétérogène ; il contient surtout

FIG. II. 3. 1.

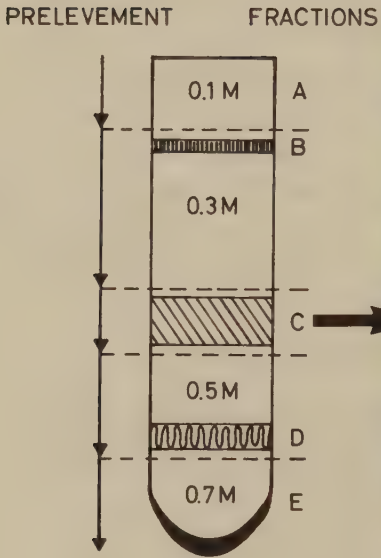


FIG. II.3.2

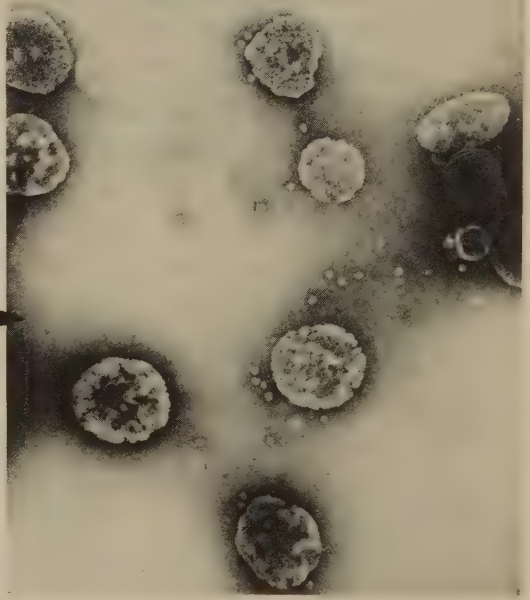


Figure II.3.1 : Aspect et distribution des bandes sur les gradients discontinus de sucrose. Les gradients sont centrifugés à $64'000 \times g$ pendant 40 minutes. Ils sont composés, de bas en haut, par : 8 ml sucrose 0,7 M ; 8 ml sucrose 0,5 M ; 12 ml sucrose 0,3 M, 0,1 M urée. Toutes ces solutions sont préparées en milieu physiologique salin Torpille, exempt de sucrose et d'urée. Le culot à fractionner est mis en suspension dans le milieu physiologique 0,1 M sucrose, 0,3 M urée et 6 ml de cette suspension sont appliqués par gradient. Le sens du prélèvement et la taille des fractions sont indiqués par les flèches. Pour les contrôles morphologiques et les dosages biochimiques, le culot E est resuspendu soit dans le sucrose 0,7 M restant au-dessus, soit dans 3 à 5 ml de tampon physiologique Torpille, 0,1 M sucrose, 0,3 M urée.

Figure II.3.2 : Préparation de synaptosomes isolés sur gradient discontinu de sucrose. Contrôle morphologique en microscopie électronique de la bande C contenant la majorité des synaptosomes intacts. Une goutte de la suspension préalablement fixée au glutaraldéhyde 2 % final, est examinée sur grille de 200 meshes, après coloration négative au NaPT 1 %, pH 7,2. Grossissement : $40'000 \times$. La taille moyenne d'un synaptosome, sur nos micrographies, est estimée à 1,5-2 microns.

des fragments membranaires (membrane post-synaptique), du collagène et également des agrégats de terminaisons nerveuses.

ACH, ENZYMES ET PROTEINES.

La distribution de ces substances, dosées dans chaque fraction, figure sur le tableau II.3.1.

ACH et CAT :

En moyenne le 23 % de l'ACH totale du tissu entier se retrouve dans le filtrat F. Cette quantité correspond à de l'ACH protégée de l'hydrolyse enzymatique par l'ACH_E du tissu ; elle représente le 43 % de l'ACH dite "vésiculaire" dosée dans l'homogénat du tissu entier (HOM). Après la première centrifugation de 6'000 x g, le 57 % de l'ACH du filtrat sédimente dans le culot, tandis que le 29 % reste dans le surnageant et correspond certainement à l'ACH des vésicules synaptiques libres, puisque toute ACh mise en solution est aussitôt hydrolysée par l'ACH_E présente. La récupération R_F est donc satisfaisante. Sur les gradients l'ACH se répartit de façon équivalente entre les bandes C et D. L'absence d'un pic net d'ACH provient d'une dispersion des différents résultats de fractionnement ; en effet, parmi les 7 expériences décrites, 3 d'entre elles ont montré un pic d'ACH dans la fraction C, les 4 autres dans la fraction D. Le problème peut résider dans une inhomogénéité de la suspension obtenue à partir du culot ; de ce fait il subsisterait des agrégats de synaptosomes qui doivent sédimenter dans

les couches plus denses de sucrose.

Israël et coll. (1976) ont calculé que les terminaisons nerveuses occupent le 11 % du volume total de l'électroplaque ; compte tenu de cette valeur, ces auteurs estiment qu'une activité spécifique maximale de 120 nmoles d'ACh/mg de protéines devrait être atteinte dans une fraction pure de synaptosomes. Dans nos expériences, l'activité spécifique de l'ACh atteint environ 90 nmoles/mg de protéines dans la fraction C comme dans la D (voir plus loin, Tableau II.3.4) ; ces valeurs semblent donc assez proches de celle théorique indiquée ci-dessus pour une fraction pure de synaptosomes.

Dans l'organe électrique, le 60 % de la CAT est présent sous forme "soluble" dans le cytoplasme des terminaisons nerveuses ; les vésicules synaptiques n'en contiennent pas (Israël, 1970). Le tableau II.3.1 montre que l'ACh et l'activité enzymatique de la CAT se distribuent de manière semblable au cours du fractionnement subcellulaire, ce qui indique une localisation dans les mêmes structures. En moyenne, le 90 % de la CAT du tissu (HOM) se retrouve dans le filtrat F ; de cette quantité le 16 % sédimente dans le culot de 6'000 x g, le 29 % restant dans le surnageant. La récupération R_F paraît faible ; par contre, sur les gradients, la R_G se montre excessive (252 %). L'activité enzymatique, déterminée dans le culot de 6'000 x g est certainement sous-estimée ; ceci provient probablement d'une solubilisation incomplète de l'enzyme lors du dosage du culot ; cette solubilisation est facilitée dans les fractions du gradient, moins concentrées en matériel extractable. L'addition de détergent s'avère donc indispensable pour obtenir une activité enzymatique aussi complète que

TABLEAU II.3.1.

DISTRIBUTION SUBCELLULAIRE DE SUBSTANCES DOSEES DANS CHAQUE FRACTION

SUBSTANCE*	TOT**	HOM	FILTRAT	SURN.	CULOT	R _F EN % DE F	FRACTIONS GRADIENT					R _G EN % DE CULOT
							A	B	C	D	E	
PROTEINES Mg/g	25,1 ± 2,9	19,7 ± 3	10,8 ± 1,2	6,4 ± 0,4	3,6 ± 0,4	93	0,151 ± 0,06	0,28 ± 0,04	0,212 ± 0,04	0,259 ± 0,046	2,47 ± 0,36	94
ACH NMOLES/g	672 ± 87	353 ± 72	153 ± 12	43,8 ± 4,0	86,7 ± 5,6	85	0,74 ± 0,43	10,1 ± 2,1	14,4 ± 1,9	16,6 ± 2,7	30,5 ± 6,4	83
CAT NMOLES/h/g	/	3520 ± 951	3151 ± 592	928 ± 172	506 ± 130	46	19,6 ± 7,1	59,5 ± 20,9	137,9 ± 31,0	160 ± 38	603 ± 135	252
ACHÉ NMOLES/h/g	/	8,1 ± 0,9	5,7 ± 1,0	1,53 ± 0,13	1,88 ± 0,55	60	0,03 ± 0,01	0,33 ± 0,10	0,37 ± 0,11	0,34 ± 0,10	1,90 ± 0,65	158

Les méthodes des dosages de l'ACH et des enzymes sont identiques sous II.1. *Le taux de chaque substance est déterminé par g de tissu initial. **La valeur du TOT est déterminée par extraction de fragments entiers par du TCA 5 %. Le calcul de R_F et R_G est indiqué dans le texte. Les valeurs obtenues sont des moyennes + écarts réduits, provenant de 7 Torpilles.

possible. Or, dans nos premières expériences, nous avons omis le Triton X-100 dans tous les échantillons dosés ; cette omission explique non seulement une sous-estimation des activités enzymatiques moyennes mais également la dispersion des résultats. L'activité enzymatique de la CAT paraît assez importante dans le culot E du gradient. Le rapport CAT/ACh dans cette fraction est supérieur à celui déterminé dans les fractions C et D (20 par rapport à 10 dans C et dans D). Ceci aussi peut témoigner de la présence d'aggrégats de terminaisons nerveuses intactes, ayant sédimenté dans le culot E.

AChE et Protéines :

L'AChE, responsable de l'hydrolyse extrêmement rapide du médiateur, est considérée comme un marqueur histochimique de la membrane post-synaptique. Le tableau II.3.1 montre qu'en moyenne le 70 % de cette activité enzymatique du tissu (HOM) est présente dans le filtrat F. Le 33 % de l'activité du filtrat sédimente dans le culot de $6'000 \times g$, alors que le 27 % apparaît dans le surnageant. Sur le gradient, le culot E, contenant une forte proportion de fragments membranaires post-synaptiques, renferme la majeure partie de l'AChE du culot. Les récupérations R_F et R_G montrent qu'il existe pour l'AChE, un problème de solubilisation semblable mais moins prononcé que celui de la CAT.

Le 55 % des protéines du tissu (HOM) se retrouvent dans le filtrat F. Après centrifugation de celui-ci, le 59 % des protéines qu'il contenait passent dans le surnageant ; elles correspondent à la majeure partie des protéines "solubles"

de l'organe électrique. Le 33 % des protéines sédimente dans le culot. La R_F est satisfaisante. Sur les gradients, la fraction E, hétérogène, apparaît très riche en protéines. La récupération R_G est pratiquement totale.

En conclusion : dans le collectif analysé, les récupérations R_F et R_G s'avèrent satisfaisantes pour l'ACh et les protéines, moins pour les enzymes du métabolisme de l'ACh (CAT et AChE) ; une solubilisation inadéquate de ces enzymes au moment du dosage peut être invoquée. De plus, les résultats biochimiques, ainsi que les contrôles morphologiques, montrent que sur les gradients discontinus la majorité des synaptosomes ont migré tantôt dans la fraction C (0,3 - 0,5 M sucrose), tantôt dans la D (0,5 - 0,7 M sucrose).

DISTRIBUTION ET RECUPERATION DES THIAMINES.

Thiamine totale :

La distribution de la thiamine totale (Thia + esters-P), ainsi que ses récupérations R_F et R_G , sont considérées sur le tableau II.3.2.

La teneur en thiamine totale (nmoles/g de tissu initial), déterminée dans le filtrat F s'avère en moyenne supérieure à la teneur du tissu entier (TOT ; HOM). Cette apparente sur-estimation pourrait s'expliquer par une extraction acide facilitée par rapport à celle du tissu entier, où la concentration élevée de protéines peut interférer. Une sous-estimation du taux de thiamine totale dans le tissu entier a déjà été mentionnée au début de ce travail.

En moyenne le 37 % de la thiamine totale contenue dans

TABLEAU II.3.2

DISTRIBUTION DE LA THIAMINE TOTALE (Thia + Esters-P) DANS CHAQUE FRACTION

NMOLES/G DE TISSU INITIAL : MOYENNES $\pm$ ECARTS STANDARDS

TOT*	HOM	FILTRAT	SURN.	CULOT	R _F **	FRACTIONS GRADIENT					"TOTAL GRADIENT"	R _G **
						A	B	C	D	E		
97,9 ± 37,0	161 ± 87	335 ± 150	123 ± 40	23,6 ± 9,3	44 %	12,8 ± 4,8	25,6 ± 9,9	26,6 ± 5,4	21,7 ± 6,7	10,3 ± 3,7	97 ± 11	411 %

Chaque fraction est dosée selon la technique indiquée sous II.1. La thiamine totale s'obtient par la somme de chaque composante (Thia + E). Le "TOTAL GRADIENT" est la somme des taux déterminés dans les fractions A à E. *Le total est déterminé après homogénéisation de fragments d'organe électrique dans du TCA 5 % aqueux. **La R_F et la R_G sont exprimées en % ; leur calcul est indiqué dans le texte. Les valeurs déterminées dans le total et dans l'homogénat proviennent du même collectif que le filtrat.

le filtrat reste dans le surnageant de 6'000 x g ; ce pourcentage représente donc la thiamine soluble ainsi que celle associée aux particules de faible densité. Il semble que seulement le 7 % de cette thiamine du filtrat sédimente dans le culot. Mais, il s'agit là certainement d'une sous-estimation au dosage car la récupération R_F est faible ; ceci pourrait également s'expliquer par une difficulté à l'extraction acide à partir du culot très riche en protéines. La sous-estimation de la teneur en vitamine du culot se confirme lorsqu'on considère la récupération R_G disproportionnée (411 %), obtenue sur le gradient. En admettant ces faits, nous pouvons estimer que les 97 nmoles/g de tissu initial, trouvées dans le "Total gradient" représentent en fait la quantité de thiamine totale ayant réellement sédimenté dans le culot. Cette valeur représenterait non plus 7 % mais 29 % du filtrat F ; la récupération R_F atteindrait alors 66 %.

La distribution de la thiamine totale sur le gradient est assez uniforme. Ce sont les fractions B à D qui en contiennent le plus.

Ces résultats permettent de conclure que : a) un problème existe lors de l'extraction de la thiamine à partir des fractions les plus concentrées ; b) toute la thiamine de l'organe électrique passe dans le filtrat.

Répartition de la Thia et des Esters-P :

Cette analyse est résumée dans le tableau II.3.3, où figurent les répartitions de chaque composante, en pourcent de la thiamine totale déterminée dans chaque fraction.

TABEAU II.3.3

REPARTITION DE THIA ET ESTERS-P EN % DE LA THIAMINE TOTALE

COMPOSANTE	AVANT GRADIENT				FRACTIONS GRADIENT						*"TOTAL" GRADIENT"
	HOM	FILTRAT	SURN.	CULOT	A	B	C	D	E		
THIA	36 ± 12	32,9 ± 12,2	15,8 ± 4,2	18,1 ± 6,0	24,4 ± 12,0	28,5 ± 11,7	15,3 ± 4,6	13,4 ± 7,1	30,4 ± 13	29	
TMP	19,4 ± 7,1	19,3 ± 6,3	28,2 ± 11,3	33,9 ± 11,0	15 ± 7	32,1 ± 8,5	29,0 ± 6,7	33,1 ± 11,5	30,2 ± 12	29	
TPP	19,0 ± 5,7	15,6 ± 8,2	13,4 ± 10,0	8,3 ± 5,1	1,6 ± 1,5	17,5 ± 9,0	8 ± 4	3,1 ± 2,0	3 ± 2	8	
TTP	25,7 ± 8,8	32,3 ± 11,4	30,4 ± 16,1	39,8 ± 6,3	58,9 ± 10,7	22,0 ± 10,3	47,9 ± 8,0	50,3 ± 8,7	36,4 ± 14,0	50	

Chaque composante est exprimée en % de la thiamine totale dans les différentes fractions ; les valeurs sont des moyennes + écarts réduits provenant de 7 Torpilles. *La répartition dans le "TOTAL GRADIENT" est calculée en additionnant les nmoles/g moyennes trouvées pour chaque composante dans les différentes fractions du gradient ; cette somme est rapportée à la valeur de thiamine totale trouvée dans ce "TOTAL GRADIENT" (voir tableau II.3.2).

La répartition dans le filtrat est sensiblement égale à celle obtenue dans l'homogénat du tissu (HOM). Donc, si un problème existe lors de l'extraction acide, il semble se manifester de manière identique pour toutes les composantes de la thiamine totale. Toute conclusion est difficile en ce qui concerne les valeurs obtenues dans le culot, où les récupérations sont faibles. Mais en considérant le "Total gradient" du tableau II.3.3, qui représente en fait les vraies valeurs du culot, nous trouvons une répartition assez différente d'avec celle du surnageant : la thiamine et la TTP semblent avoir sédimenté préférentiellement. Sur les gradients, la thiamine et la TPP présentent un pic assez net dans la fraction B par rapport aux autres fractions. La TTP domine en valeur absolue dans les fractions C et D correspondant à la majorité des terminaisons nerveuses occluses. Une quantité non négligeable de TTP se retrouve également dans le surnageant A (composés solubles). La TMP se distribue de manière assez égale dans les fractions B à E. La TPP est relativement peu abondante dans le culot E ; la thiamine, la TMP et le TTP s'y retrouvent en des pourcentages équivalents. C'est donc la TTP qui paraît davantage associée aux synaptosomes alors que la Thia et la TPP se localisent plutôt dans la fraction B riche en petits fragments membranaires. Cette séparation correspond-elle à une réalité fonctionnelle ? Est-ce sous cette forme de TTP que la thiamine intervient dans le fonctionnement de ce tissu électrogène ? Il est actuellement difficile de répondre à ces questions.

RELATION ENTRE LA TTP ET L'ACH.

Le calcul des activités spécifiques de l'ACH et de la TTP (nmoles/mg de protéines) dans les différentes fractions du gradient révèle un fait intéressant (Tableau II.3.4) ; non seulement la distribution de ces deux substances montre une similitude mais encore leurs activités spécifiques dans les fractions B, C et D s'avèrent très proches. Dans la fraction A, l'activité spécifique de la TTP est nettement plus élevée que celle de l'ACH ; dans cette fraction soluble, l'absence d'ACH mesurée en tant que telle s'explique par son hydrolyse complète par l'ACHé présente.

Nous pouvons donc estimer que dans les terminaisons nerveuses (fractions C et D) le rapport moyen TTP/ACH est proche de 1. Nous pouvons, sur la base de cette constatation, tenter de calculer la concentration de TTP à l'intérieur des terminaisons nerveuses. Si le volume intrasynaptosomal moyen, calculé par Morel et coll. (1978), est de $3,14 \mu\text{l/g}$ de tissu initial, la concentration intraterminale de TTP devrait atteindre 10 mM.

TABLEAU II.3.4

ACTIVITES SPECIFIQUES DE LA TTP ET DE L'ACH DANS LES FRACTIONS DU GRADIENT

SUBSTANCE*	A	B	C	D	E
ACH	5,5 ± 3,0	40,8 ± 7,6	91 ± 21	80,2 ± 17,0	12,4 ± 2,6
TTP	59,9 ± 5,9	49,4 ± 16,0	84,9 ± 14,2	51,7 ± 8,4	1,6 ± 0,6

Les activités spécifiques sont calculées en nmoles/mg de protéines de chaque fraction du gradient ; moyennes $\pm$ écarts réduits, provenant de Torpilles. Pour chaque expérience, les fractions correspondantes de 3 ou 4 gradients sont réunies.

II.4. DISCUSSION

La teneur en thiamine totale (Thia + esters-P) de l'organe électrique est estimée à 120 nmoles/g de tissu frais. Cette valeur paraît considérable en comparaison des 10 à 20 nmoles/g généralement attribuées au cerveau (von Muralt, 1947). Le rôle de cofacteur dans le métabolisme intermédiaire ne suffit pas à lui seul à justifier des taux si élevés. Il faut donc envisager une intervention de la thiamine à un autre niveau dans le fonctionnement du tissu électrogène. Cette supposition abonde dans le sens d'une hypothèse actuellement bien admise et qui attribue à la thiamine un rôle particulier dans le fonctionnement des tissus nerveux (Minz, 1938 ; von Muralt, 1949).

Les résultats d'histofluorescence associés à ceux des fractionnements subcellulaires, tendent à démontrer que le cytoplasme de l'électroplaque est relativement pauvre en thiamine ; celle-ci semble se localiser presque exclusivement dans les éléments nerveux du tissu (nerfs et terminaisons nerveuses). Les taux de thiamine totale déterminés dans les fractions correspondant aux synaptosomes, atteignent environ le 50 % de la teneur dans le tissu entier. D'après le volume intrasynaptosomal de 3,14 μ l/g de tissu initial, une concentration de 16 mM peut être estimée pour la thiamine totale des terminaisons nerveuses. Ceci justifie donc et explique la forte intensité de la fluorescence développée par les structures nerveuses, lors de l'identification

histochimique de la thiamine.

La répartition relative des 4 composantes, Thia et chaque ester-P, déterminée dans les fragments de tissu entier, diffère beaucoup de celle observée dans le cerveau, où la TPP représente environ le 80 % de la thiamine totale, la Thia, la TMP et la TTP se répartissant de manière assez égale dans les 20 % restants (Cooper et Pincus, 1973). En effet, la situation est pratiquement inversée dans l'organe électrique, où la TPP n'occupe guère que le 8 % du total. Or, la TPP ou cocarboxylase, est la forme sous laquelle la thiamine intervient comme cofacteur. La faible concentration de cet ester trouvée dans l'organe électrique, renforcerait donc l'hypothèse d'un second rôle de la thiamine dans le fonctionnement du tissu nerveux. Une autre particularité de l'organe électrique réside dans sa teneur élevée en TTP ; ceci est particulièrement frappant dans les terminaisons nerveuses où environ le 50 % de la vitamine existe sous forme de TTP. Dans ces structures, l'activité spécifique de cet ester supérieur et celle de l'ACh, sont pratiquement identiques. Ces faits suggèrent que la TTP pourrait être la forme de thiamine spécifiquement associée au fonctionnement des tissus excitables ; plus précisément, la TTP pourrait intervenir dans les mécanismes de la transmission synaptique, en jouant un rôle dans la synthèse et/ou la libération du transmetteur. Dans cette hypothèse, son taux considérable dans l'organe électrique n'est pas surprenant, vu l'extrême richesse de ce tissu en terminaisons nerveuses.

III

VARIATIONS DE LA THIAMINE, DE SES ESTERS-P ET DE L'ACH DANS
DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES.

Les 3 séries d'expériences qui vont suivre sont toutes réalisées dans le but de dégager une éventuelle relation entre la vitamine B₁ et l'ACh, dans le fonctionnement de ce tissu nerveux qu'est l'organe électrique. En effet, la stimulation, l'homogénéisation, ainsi qu'une modification du rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dans le milieu extérieur, sont toutes des conditions qui entraînent des variations caractéristiques et importantes du taux de l'ACh et de sa répartition dans les compartiments du tissu. De telles variations nous ont paru particulièrement favorables pour détecter des relations fonctionnelles et biochimiques entre l'ACh et les différents composés thiaminiques.

III.1 STIMULATION ELECTRIQUE DU TISSU

Plusieurs auteurs ont démontré que la stimulation électrique d'un tissu nerveux produisait une libération importante de thiamine, essentiellement sous forme de thiamine et TMP ; cette sortie de thiamine proviendrait de la déphosphorylation des esters-P supérieurs, induite par la stimulation.

Une stimulation répétitive prolongée de l'organe électrique produit un épuisement de la décharge, qui survient plus ou moins rapidement selon la fréquence de stimulation. L'évolution de la décharge en cours d'activité, présente successivement une diminution exponentielle, un plateau, suivi à nouveau d'une diminution (Dunant et coll., 1977). Les variations du taux d'ACh totale, enregistrées en cours d'une telle

stimulation, ont déjà été décrites (Introduction, I.2). L'oscillation lente de l'ACh concorde bien avec les 3 phases de la réponse électrophysiologique vues ci-dessus. L'oscillation rapide, non amortie, paraît très difficile à mettre en relation avec une quelconque variation électrophysiologique. Il faut rappeler que ces 2 oscillations du transmetteur concernent seulement son compartiment libre.

L'analyse du comportement de la thiamine et ses esters-P, en cours de stimulation, est effectuée sur une durée correspondant à la 3ème période de l'oscillation rapide du taux d'ACh, avec une résolution dans le temps de 1 seconde. Cette variation caractéristique du transmetteur, ainsi que l'amplitude considérable de l'oscillation, nous ont paru particulièrement favorables pour détecter une relation fonctionnelle possible entre la thiamine et l'ACh. A cet égard, l'oscillation rapide de l'ATP, en phase avec celle de l'ACh, est également intéressante.

PRINCIPE.

Des fragments d'organe électrique frais sont soumis à une stimulation répétitive en champ électrique, pour des durées allant de 11 à 15 secondes. En cours de stimulation les échantillons sont prélevés toutes les secondes et immédiatement inactivés par immersion dans de l'azote liquide. L'ACh et les 4 composés thiaminiques (Thia + esters-P) sont extraits en pulvérisant les échantillons ainsi congelés, avec du TCA 5 %. Ces substances sont ensuite dosées par les méthodes décrites précédemment.

MATERIEL ET METHODES

PROCEDE.

Stimulations :

Des fragments de tissu, constitués de 1 à 3 prismes, sont délicatement excisés afin de ne pas endommager les électroplaques. Une incubation préalable d'1 heure, dans le tampon physiologique Torpille, permet d'atténuer les effets de l'excision. Les fragments sont ensuite pesés et placés sur une toile de nylon rigide, de dimensions légèrement supérieures aux fragments ; deux électrodes de stimulation sont fixées sur cette toile, longitudinalement par rapport aux prismes. Une telle stimulation est très efficace car elle permet au champ électrique d'atteindre facilement les nerfs autour et entre les électroplaques (Fessard, 1947). L'ensemble est alors continuellement superfusé en cours de stimulation par un flux de tampon physiologique. Il est important à cet égard, que la toile de nylon ainsi que l'échantillon soient constamment mouillés, ce qui permet un passage régulier du champ électrique. Des chocs supramaximaux (100-150 volts) de brève durée (0,5-1 msec) sont appliqués à la fréquence de 5 Hz. La décharge électrique est enregistrée aux deux extrémités des prismes.

Inactivation du tissu et extraction de l'ACh et des thiamines.

Chaque échantillon stimulé pendant une durée donnée (11,12,13,14 ou 15 sec) est aussitôt inactivé par immersion dans de l'azote liquide. Le temps de latence entre la stimulation et l'inactivation atteint en moyenne 0,25 seconde. Des témoins

non stimulés sont traités de manière identique, en mimant la stimulation. Une périodicité dans le protocole expérimental est évitée en choisissant au hasard l'ordre dans lequel ces différentes durées de stimulation se succèdent. Une telle série de stimulations est répétée autant de fois que l'on désire d'échantillons pour chaque durée de stimulation.

Pour l'extraction, 3 à 5 ml de TCA 5 % sont ajoutés aux fragments maintenus congelés dans un mortier ; l'ensemble est alors pulvérisé aussi finement que possible en présence d'azote liquide. Après décongélation des extraits à température ambiante et centrifugation, le TCA est extrait à l'éther, et les dosages de l'ACh et des thiamines sont effectués selon les méthodes décrites précédemment.

RESULTATS

LIBERATION DE THIAMINE PAR LA STIMULATION.

Dans des expériences préliminaires, nous avons testé si une stimulation répétitive en champ électrique incitait l'organe électrique à une libération importante de thiamine dans le milieu. Des fragments de tissu (1 à 3 prismes) ayant préalablement incorporé de la $[(2-^{14}\text{C})\text{-thiazole}]\text{-Thiamine}$ sont soumis à une stimulation répétitive supramaximale (150 volts durée 1 msec), prolongée pendant 3 minutes, à la fréquence de 10 Hz. Dans ces conditions, la radioactivité détectée dans le superfusat n'a montré aucune augmentation significative par rapport à sa valeur basale, déterminée avant la stimulation.

VARIATIONS DANS LE TISSU.

Les résultats obtenus, pour des stimulations répétitives allant de 11 à 15 secondes, proviennent de 2 Torpilles, une du mois de janvier, l'autre du mois de mai ; respectivement 3 et 4 fragments sont extraits pour chaque point expérimental. Les taux de thiamine totale (nmoles/g de Thia + esters), au contraire de ceux de l'ACh totale, présentent une très grande dispersion, variant de 50 à 300 nmoles/g ; cette dispersion affecte d'une manière générale les témoins et toutes les durées de stimulation, indifféremment pour les 2 Torpilles. Afin de diminuer cette grande variabilité des résultats, nous avons éliminé les échantillons présentant des taux trop extrêmes de thiamine totale en nous basant sur les limites de confiance ($m \pm t.s/ n$). De la sorte, les échantillons restants (4 à 5 par point expérimental) présentent des taux de thiamine totale allant de 50 à 100 nmoles/g. Les valeurs de l'ACh (nmoles/g) correspondant aux échantillons éliminés, sont également écartées.

En premier lieu, nous allons analyser les variations de la thiamine totale (Thia + esters-P) ainsi que de l'ACh, estimée dans les mêmes échantillons ; dans un second temps, nous étudierons les variations de la thiamine et de ses esters-P, considérés dans leur ensemble, TMP + TPP + TTP.

Variations de la thiamine totale et de l'ACh :

La figure III.1.1, montre ces variations en fonction des différentes durées de stimulation. Les valeurs sont exprimées en nmoles/g.

1. Variation de l'ACh : Les taux d'ACh obtenus ici montrent des différences significatives entre les points suivants

FIG. III. 1. 1.

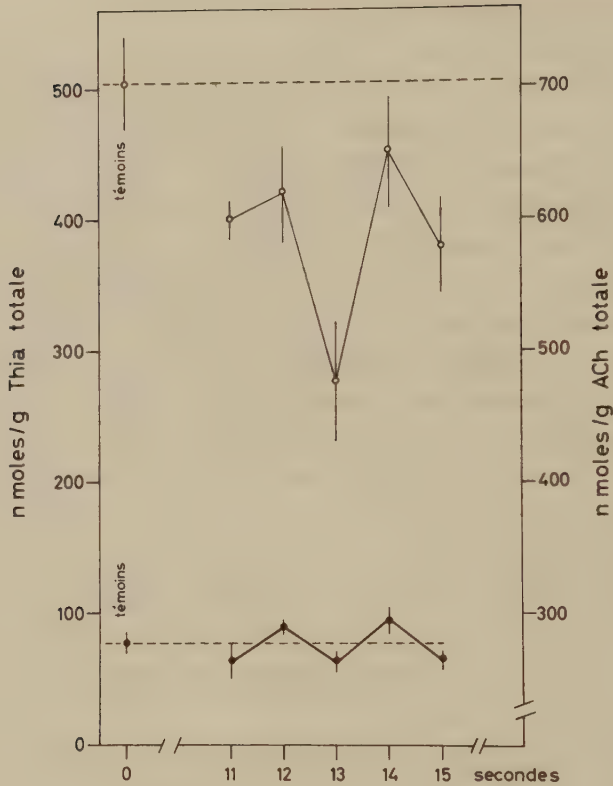


Figure III.1.1 : Stimulation répétitive en champ électrique, à 5 Hz, sur une période allant de 11 à 15 secondes ; cette période correspond à la 3ème période de l'oscillation rapide de l'ACh. ●—● : variations du taux de thiamine totale (Thia + esters-P) en fonction du temps de stimulation (sec). En ordonnées : nmoles/g moyennes + écart réduit. ○—○ : variations de l'ACh totale (nmoles/g moyennes + écart réduit), dosée dans les mêmes extraits TCA que les thiamines. Les dosages sont effectués avec une résolution dans le temps de 1 seconde. Pour chaque point expérimental, témoin et stimulé, $n = 4$.
★ Le point de 14 secondes est la moyenne de 5 échantillons. Pour chaque tracé, la ligne pointillée représente le niveau moyen des témoins, déterminé au repos. Pour la thiamine totale, ce niveau équivaut à $78 \pm 7,3$ nmoles/g ; pour l'ACh totale il est de 705 ± 36 nmoles/g.

de stimulation : une diminution moyenne de 143 nmoles/g entre 12 et 13 secondes ($p = 5 \%$) ; une augmentation moyenne de 175 nmoles/g entre 13 et 14 secondes ($2 \% < p < 5 \%$). Durant toute la période de stimulation (11 à 15 sec), la variation du transmetteur se situe en moyenne à un niveau inférieur au témoin non stimulé (705 nmoles/g). En cours de stimulation, la valeur la plus basse du taux d'ACh est donc obtenue après 13 secondes de stimulation. Les taux d'ACh aux points 12 et 14 secondes ne diffèrent pas significativement de ceux déterminés au repos.

Ces variations d'ACh concordent bien avec les valeurs obtenues dans des expériences antérieures. En effet, la 3e période de l'oscillation rapide de l'ACh présente généralement un creux à 13 secondes et un maximum à 14 ou 15 secondes.

2. Variation de la thiamine totale : les taux de thiamine totale varient significativement en cours de stimulation, du moins entre les points suivants : entre 12 et 13 secondes, les taux de thiamine totale diminuent en moyenne de 26 nmoles/g ($1 \% < p < 2 \%$), puis ils augmentent entre 13 et 14 secondes d'une valeur moyenne de 30 nmoles/g ($1 \% < p < 2 \%$) ; une diminution de 29 nmoles/g se produit à nouveau entre 14 et 15 secondes ($2 \% < p < 5 \%$). Durant la période entière de la stimulation, la variation de la thiamine totale s'effectue à un niveau moyen égal au taux déterminé dans les témoins (78 nmoles/g).
3. Comparaison entre ACh et Thiamine totale : les points de stimulation qui diffèrent significativement pour l'ACh

le font également pour la thiamine totale ; donc, lorsque les taux d'ACh diminuent entre 12 et 13 secondes et remontent entre 13 et 14 secondes, les taux de thiamine varient dans les mêmes directions, entre ces mêmes points. De plus, entre 12 et 14 secondes, la variation moyenne d'ACh engage 159 nmoles/g, c'est-à-dire environ le 23 % de l'ACh totale déterminée au repos. Comparativement, la thiamine totale varie en moyenne de 28 nmoles/g, ce qui représente environ le 35 % de sa valeur au repos.

En résumé, entre 12 et 14 secondes de stimulation répétitive à 5 Hz, les taux de thiamine totale ainsi que ceux de l'ACh varient significativement dans un même sens ; les taux les plus bas se situent à 13 secondes de stimulation. L'amplitude relative de la variation paraît plus importante pour la thiamine totale que pour l'ACh.

Variations de la thiamine et de ses esters-P :

La variation de la thiamine totale, étudiée ci-dessus, résulte en fait de la somme des variations individuelles de la thiamine et de ses esters-P. Comment ces deux composantes, les esters-P étant considérés dans leur ensemble, se sont-elles comportées en cours de la stimulation ?

Sur la figure III.1.2, sont tracées les variations de la thiamine ainsi que celles de ses esters, exprimés en nmoles/g. A première vue, les esters-P (TMP + TPP + TTP) semblent décrire une variation beaucoup plus importante que la thiamine. Cette impression est confirmée par l'analyse statistique. La thiamine non estérifiée présente une augmentation significative en cours de stimulation entre 11 et 12 secondes ; à partir de 12 secondes, elle ne varie pratiquement plus. Durant toute la stimulation le taux de thiamine se maintient à un

FIG.III.1.2

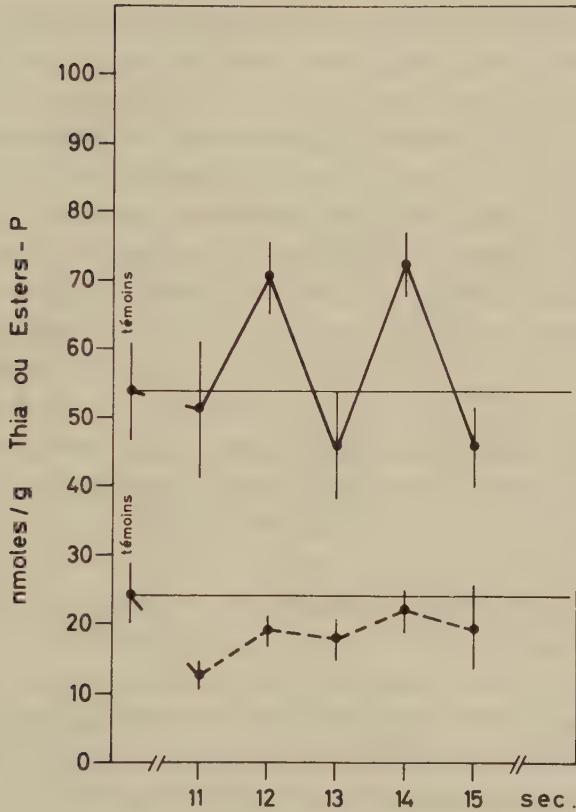


Figure III.1.2 : Stimulation répétitive en champ électrique, à 5 Hz, pour une période allant de 11 à 15 secondes. Variations de la thiamine (●---●) et de ses esters-P (●—●) en cours de stimulation. En ordonnée : nmoles/g, $m \pm$ écart réduit ; en abscisse : durées de stimulation (secondes). La somme de ces deux variations donne la variation de la thiamine totale de la figure III.1.1. Les différences significatives entre les points sont indiquées dans le texte. Valeurs moyennes des témoins : Thia = 24,1 nmoles/g ; Esters-P = 54 nmoles/g.

niveau inférieur à celui des témoins non stimulés (24.6 nmoles/g)

Les esters-P, eux, présentent une variation très significative en cours de stimulation. Leur taux n'augmente pas significativement entre 11 et 12 secondes ; par contre, il diminue nettement entre 12 et 13 secondes, pour atteindre une valeur proche de celle au repos ; entre 13 et 14 secondes il se produit une augmentation importante, suivie d'une nouvelle diminution jusqu'à la valeur de repos, entre 14 et 15 secondes. La moyenne des valeurs que les esters-P atteignent à 12 et 14 secondes (71 nmoles/g) est significativement supérieure à leur taux au repos (54,1 nmoles/g).

D'après ces résultats, il semble donc que la variation significative de la thiamine totale, observée auparavant, soit principalement due aux esters-P.

Comparaison de ces variations avec celle de l'ACH :

Tout au long de la stimulation, les taux de thiamine non estérifiée, comme ceux de l'ACH totale du tissu, tendent à se maintenir à des niveaux inférieurs à ceux déterminés dans les témoins. Les esters-P, par contre, évoluent plutôt à un niveau supérieur aux témoins, tout en variant dans le même sens que le transmetteur ; à savoir, lorsque l'ACH augmente ou diminue entre 12 et 14 secondes, les esters-P font de même. Entre ces points, l'amplitude moyenne de la variation des esters est de 23 nmoles/g, ce qui représente le 43 % des taux déterminés au repos.

DISCUSSION

En résumé, une stimulation répétitive de l'organe électrique, sur des durées couvrant la 3e période de l'oscillation

rapide de l'ACH, induit une variation significative de la thiamine totale, principalement due aux esters-P. Dans ce collectif, la variation de l'ACH, dosée dans les mêmes fragments de tissu, est significative entre les mêmes points et évolue dans le même sens que celle des esters-P de la thiamine. Il est ainsi probable que ces esters, au cours de plus longues stimulations, oscillent en phase avec l'ACH.

L'amplitude relative de la variation semble plus grande pour les esters-P (43 % de la valeur des témoins) que pour l'ACH (23%).

Il faut cependant remarquer que l'oscillation rapide de l'ACH totale, nous l'avons vu (Dunant et coll., 1972 ; 1977), concerne principalement l'ACH "libre", la liée ne bougeant pratiquement pas dans les conditions de stimulation décrites ici. Au repos, l'ACH "libre" occupe le 50 % de l'ACH totale, ce qui représente d'après nos résultats, environ 350 nmoles/g. Comme la variation de l'ACH a engagé 159 nmoles/g, cela équivaut à environ 45 % du compartiment "libre", une valeur remarquablement proche de celle des esters-P de la thiamine. Ce rapprochement suggère une relation entre les esters de la thiamine et la fraction libre du transmetteur, celle dont le turnover est accéléré pendant la transmission. Nous pourrions également comparer le comportement de la thiamine non estérifiée avec celui de l'ACH liée aux vésicules synaptiques. Ni l'une ni l'autre ne présentent de modification significative au cours de telles stimulations.

Pourquoi la totalité des thiamines varie-t-elle en cours de stimulation ? Logiquement pour chaque ester-P formé, une molécule de thiamine devrait disparaître, donc le total devrait

se maintenir constant. Le fait que seuls les esters-P varient et ce, à un niveau supérieur de leur taux au repos, suggère l'hypothèse suivante : une proportion assez importante de thiamine et/ou d'ester, existerait sous forme associée à un constituant cellulaire, ce qui empêcherait, soit son extraction, soit son dosage par le ferricyanure ; périodiquement, en cours de stimulation, une phosphorylation de cette thiamine la libérerait de sa liaison, une déphosphorylation la ramenant à son état lié. L'oscillation rapide de l'ACh ne produit pas une telle variation correspondante de l'amplitude du potentiel, donc ne pourrait s'expliquer par une libération périodique en cours de stimulation. Il serait tentant d'imaginer, vu les comportements analogues de l'ACh et de la phosphorylation de la thiamine, que dans les creux de l'oscillation, la thiamine et l'ACh se trouvent associées d'une quelconque manière, échappant ainsi au dosage.

L'ATP oscille en phase et dans un rapport 1 : 1 avec l'ACh (Israël et coll., 1977). La thiamine est phosphorylée aux dépens de l'ATP ; par conséquent nous supposons trouver en cours de stimulation, une oscillation ATP-esters-P de la thiamine, en opposition de phase ; un léger retard dans la variation des esters sur celle de l'ATP, échapperait à l'analyse.

III.2 HOMOGENEISATION DU TISSU

L'homogénéisation de l'organe électrique, dans des conditions isoosmotiques, révèle la présence des compartiments "lié" et "libre" de l'ACh ; ce dernier est déterminé par différence entre l'ACh totale, mesurée dans le tissu entier, et l'ACh liée, restant après homogénéisation. L'ACh liée est, dans sa plus grande partie, associée aux vésicules synaptiques, ce qui explique pourquoi elle n'est pas hydrolysée par la cholinestérase lorsque les terminaisons nerveuses sont rompues. De plus, lors de l'homogénéisation, il se produit également une diminution significative du taux d'ATP, par rapport au taux déterminé dans le tissu entier (Israël et coll., 1977).

PRINCIPE.

Des fragments de tissu électrogène, provenant de plusieurs poissons, sont rapidement homogénéisés dans le tampon physiologique. Sitôt après, les homogénats sont traités par du TCA et leur contenu en ACh, thiamine et esters-P comparé à celui extrait de fragments du tissu entier.

MATERIEL ET METHODES

PROCEDE.

Des fragments minces d'organe électrique frais, pesant 0,3 à 0,5 g, sont préalablement incubés pendant 30 minutes

à 1 heure dans le tampon physiologique Torpille, afin d'atténuer les effets dus à l'excision. Chaque fragment est alors plongé dans 1 à 1,5 ml de tampon physiologique à 5°C et homogénéisé dans un homogénéisateur de type Potter-Elvehjem, verre-verre. Après 3 minutes, une solution de TCA à 50 % (p/v) est ajoutée, à raison de 1 volume pour 10 volumes d'homogénat. La suspension est alors bien mélangée et centrifugée pour éliminer le précipité protéique. Pour toutes les homogénéisations qui vont suivre, quel que soit le milieu d'homogénéisation, le procédé appliqué sera le même. Les extractions, à partir de fragments tissulaires entiers, sont effectuées parallèlement, en homogénéisant dans le TCA, des échantillons préalablement incubés 1 h (0°C) dans l'acide. Les composés thiaminiques et l'ACH sont dosés dans les extraits de tissu entier et d'homogénats par les techniques décrites précédemment. L'effet de l'homogénéisation est évalué par le test statistique des séries appariées, en établissant, pour chaque couple de valeurs, la différence "tissu entier-homogénat", et en comparant la moyenne des différences à 0. La différence est considérée comme significative lorsque p est inférieur ou égal à 5 %.

RESULTATS

Quels sont les effets d'une telle homogénéisation au niveau de la thiamine et ses esters-P ? Afin de permettre une généralisation des résultats, nous avons expérimenté sur 5 Torpilles différentes, correspondant à diverses périodes de l'année. Pour chaque Torpille, les valeurs des thiamines et

de l'ACh, dans le tissu entier ainsi que dans l'homogénat, constituent la moyenne de 2 ou 3 fragments tissulaires.

ACh ET THIAMINE TOTALE.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau III.2.1. Comme prévu, l'ACh liée (nmoles/g) retrouvée dans les homogénats, équivaut environ à la moitié de l'ACh totale, déterminée dans les extraits de tissu entier. Par contre, les taux moyens de thiamine totale (nmoles/g de Thia + Esters-P) n'ont pas subi de modification significative au cours de l'homogénéisation.

THIAMINE ET ESTERS-P.

Il est alors intéressant de voir si la répartition entre thiamine et esters-P, exprimés en % de la thiamine totale, montre une redistribution lors de l'homogénéisation. La figure III.2.1 montre que l'homogénéisation entraîne une phosphorylation significative de la thiamine au profit des esters-P, considérés dans leur totalité (TMP + TPP + TTP). Parmi ceux-ci, la TTP mérite une mention spéciale ; en effet, dans ce collectif de Torpilles, la TTP, contrairement aux autres esters dont la variation moyenne n'est pas significative, présente toujours une augmentation nette lors de l'homogénéisation. De plus, un test de corrélation révèle l'existence d'une relation linéaire significative, de pente négative, entre les

TABLEAU III.2.1

TORPILLE	THIAMINE TOTALE (NMOLES/G)		ACH (NMOLES/G)	
	TISSU ENTIER	HOMOGENAT	TISSU ENTIER	HOMOGENAT
1 (N = 2)	98,6	117,9	843	511
2 (N = 2)	85,5	84,7	502	152
3 (N = 2)	44,9	48	579	155
4 (N = 2)	78,2	89,4	648	377
*5 (N = 3)	22,1	49,8	357	184
MOYENNE ET ECART REDUIT	65,9 ± 14,1	77,9 ± 13,2 N.S	586 ± 81	276 ± 72 2 % < P < 5 %

Effet de l'homogénéisation en milieu physiologique, sur le contenu en Thiamine totale (Thia + E-P) et en ACh. (N), indique le nombre de fragments extraits par Torpille, respectivement pour le tissu entier et pour l'homogénat. L'ACh est dosée dans les mêmes extraits que la Thiamine totale. *Dans ce collectif, les échantillons provenant de la Torpille 5, étant inclus dans une expérience nécessitant des incubations, ont donc subi 2 h d'incubation en milieu physiologique Torpille, sous courant constant d'oxygène (5 % O₂, 95 % O₂). Les différences significatives sont calculées d'après le test statistique des séries appariées, en établissant pour chaque couple de valeurs la différence "Tissu entier - homogénat" et en comparant la moyenne des différences.

FIG. III. 2. 1

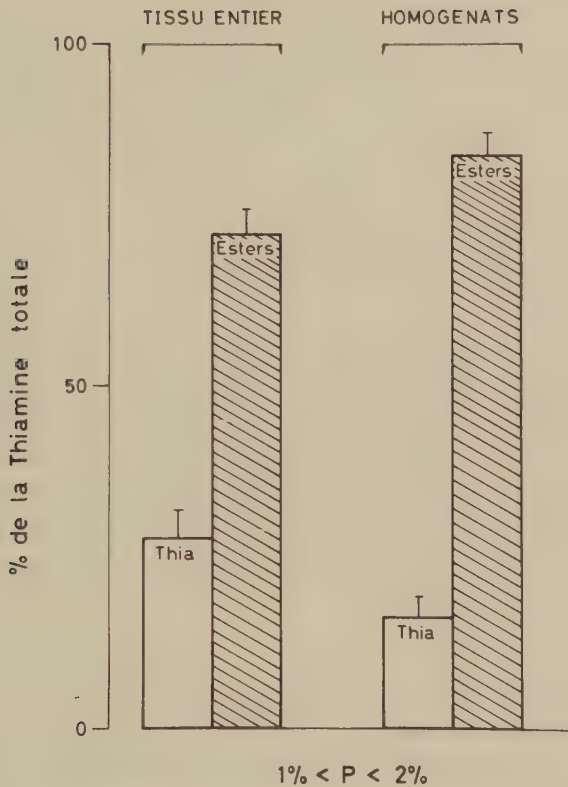


Figure III.2.1 : Répartition de la thiamine et des esters-P totaux, en % de la thiamine totale. Ces valeurs sont déterminées dans le tissu entier et après homogénéisation dans des conditions isoosmotiques. Les valeurs moyennes obtenues proviennent de 5 Torpilles (voir Tableau III.2.1). Le test de "t" permet de déterminer une différence significative dans la répartition en passant du tissu entier au tissu homogénéisé.

FIG. III. 2. 2.

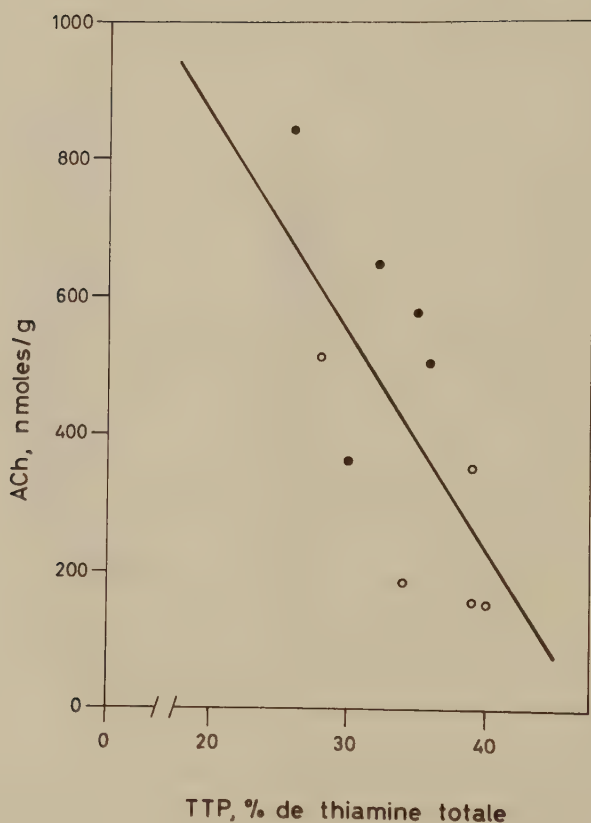


Figure III.2.2 : Homogénéisation du tissu dans des conditions isoosmotiques. Relation linéaire inverse, significative, entre la variation de l'ACh (nmoles/g) et celle de la TTP (en % de la thiamine totale) mesurées dans les mêmes extraits de tissu entier (●) et de tissu homogénéisé (○). Le facteur de corrélation est de 0,683, pour $ddl-2 = 8$, $2 \% < p < 5 \%$. La pente négative de la droite est de - 31,4 et l'ordonnée à l'origine correspond à 1'493 nmoles/g d'ACh.

nmoles/g d'ACh et le % de TTP, tous les deux étant déterminés dans les mêmes extraits de tissu entier et d'homogénat provenant des 5 Torpilles (Figure III.2.2). En résumé, moins il y a d'ACh dosée dans ces échantillons, plus la thiamine y est phosphorylée en TTP.

DISCUSSION

L'homogénéisation du tissu dans un milieu isoosmotique, où les concentrations ioniques sont égales à celles du milieu extracellulaire des élasmobranches, induit :

- a. une perte d'ACh "libre", probablement cytoplasmique, qui est aussitôt hydrolysée par l'ACHé ;
- b. une phosphorylation de la thiamine surtout au profit de la TTP ;
- c. une hydrolyse de l'ATP.

Une relation entre l'ACh libre et la TTP existe. Plus la quantité d'ACh libérée par l'homogénéisation augmente, plus le taux de phosphorylation en TTP s'accroît ; ou inversement, plus le tissu intact contenait d'ACh libre, moins la thiamine se trouvait phosphorylée. L'homogénéisation du tissu cause donc essentiellement une perte du compartiment du transmetteur qui est disponible pour la libération ; en ce sens, elle pourrait être assimilée à une brusque stimulation. De plus, l'homogénéisation ouvre les terminaisons nerveuses et de ce fait, rompt les barrières de perméabilité sélective aux différents ions du milieu extra- et intracellulaire. Donc, cette opération crée une situation qui, par rapport au contenu

des terminaisons nerveuses, équivaut à une entrée massive de Ca^{2+} . Or, une accumulation intraterminale de Ca^{2+} se produit normalement, lorsque le tissu est stimulé (Babel-Guérin et coll., 1977). L'hypothèse suivante pourrait être suggérée : l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire activerait la synthèse des esters-P de la thiamine à partir de l'ATP ; ces réactions de transphosphorylation pourraient "déstabiliser" une quantité donnée d'ACh qui, de la sorte, deviendrait accessible à l'hydrolyse par les cholinestérases du tissu.

III.3 MODIFICATIONS DES CONCENTRATIONS DE Ca^{2+} ET Mg^{2+} DANS LE MILIEU EXTERIEUR

L'importance du calcium et du magnésium dans le fonctionnement et le métabolisme cellulaire a été largement investiguée. Dans la plupart des cellules, la concentration intracellulaire de Ca^{2+} est faible alors que celle du Mg^{2+} est relativement élevée. Le calcium ionisé joue un rôle important dans les mécanismes de la transmission synaptique en général (Del Castillo et Katz, 1954) et son action est antagonisée par le Mg^{2+} (Del Castillo et Engbaeck, 1954). Plus précisément, le Ca^{2+} intervient dans les mécanismes de libération de l'ACh (Harvey et McIntosh, 1940) et d'autres neurotransmetteurs (Rubin, 1970). L'hypothèse généralement admise propose que, lors d'une dépolarisation, le Ca^{2+} entre dans les terminaisons nerveuses et y déclenche les mécanismes responsables de la libération du transmetteur (Katz, 1969).

Dans l'organe électrique de Torpille, le calcium plasmatique varie entre 3,5 mM (hiver) et 4,4 mM (été). Le rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ non seulement détermine la quantité de transmetteur libéré, mais encore influence la répartition intracellulaire du transmetteur (Babel-Guérin, 1974) ainsi que les taux d'ATP (Israël et coll., 1977).

Etant donné ces effets, et sachant que le calcium et le magnésium modulent les réactions de phosphorylation et déphosphorylation de la thiamine, nous avons entrepris ces expériences dans le but de trouver une relation biochimique entre l'ACh et la vitamine B_1 .

PRINCIPE.

Des fragments d'organe électrique sont préalablement incubés dans le tampon physiologique Torpille, où le rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ a été modifié. L'effet de ces modifications sur les composés thiaminiques et sur l'ACh, est analysé dans des extraits tissulaires entiers ainsi que dans des homogénats.

MATERIEL ET METHODES

PROCEDE.

Le tampon physiologique Torpille usuel contient 4,4 mM de CaCl_2 et 1,8 mM de MgCl_2 . La concentration totale de ces deux cations divalents atteint donc 6,2 mM. Ce milieu physiologique est modifié comme suit quant à ses concentrations respectives en calcium et magnésium (en mM) :

- $\text{Ca}^{2+}/0$, où tout le MgCl_2 est remplacé par une concentration équivalente en CaCl_2 ;
- $0/0$, où les deux cations divalents ont simplement été omis ; ceci n'entraîne pas de changement marquant dans l'osmolarité du milieu, vu leur faible concentration dans le tampon physiologique normal ; il faut remarquer que sans adjonction d'EDTA, les concentrations de ces deux ions ne sont pas réellement nulles dans le milieu extérieur. L'EDTA a été omis volontairement ; en effet, dans des expériences préliminaires, son adjonction dans le milieu d'incubation a donné, avec les thiamines, des résultats complexes quant

à leur interprétation biochimique et physiologique. Par ailleurs, en absence de calcium extracellulaire, l'organe électrique a tendance à retenir le 50 % de son calcium endogène (Babel-Guérin, 1974) ;

- O/Mg^{2+} , où tout le $CaCl_2$ du milieu est remplacé par une concentration équivalente de $MgCl_2$;
- Ca^{2+}/Mg^{2+} , qui contient les concentrations physiologiques de chaque cation ; ce milieu est utilisé pour les groupes témoins.

En moyenne, 6 fragments d'organe électrique aussi minces que possible (2-5 mm) et pesant 0,3-0,5 g, sont incubés dans 25 ml de chacune des solutions ci-dessus. Des incubations de 2 heures sont menées à température ambiante, en bullant constamment les solutions avec un courant gazeux d'oxy-carbone (5 % CO_2 ; 95 % O_2). Après 1 heure d'incubation, toutes les solutions sont renouvelées afin de permettre un échange aussi complet que possible entre le milieu et le tissu. En raison de la géométrie particulière du tissu électrogène, les échanges avec le milieu extérieur sont lents. Pour un fragment de 5 mm d'épaisseur il faut environ 109 minutes pour que la concentration de $CaCl_2$ du milieu extérieur s'équilibre avec le centre du tissu (Dunant et coll., 1972).

Après incubation, une partie des échantillons est homogénéisée dans la solution de TCA 5 %. L'ACh totale et les composés thiaminiques sont dosés dans ces extraits que nous désignerons par "Tissu entier". D'autres échantillons sont homogénéisés dans des milieux identiques à ceux qui ont servi à leurs incubations respectives. L'extraction

subséquente par le TCA est effectuée. Les taux d'ACH et des composés thiaminiques, déterminés dans chaque homogénat, seront alors comparés aux résultats obtenus ci-dessus, dans les échantillons de "tissu entier" correspondants.

Enfin, il était aussi intéressant de connaître les effets d'une adjonction de calcium ou de magnésium au moment de l'homogénéisation. Dans ce but, certains des fragments tissulaires, préalablement incubés dans le milieu exempt de CaCl_2 et de MgCl_2 (0/0), sont ensuite homogénéisés soit dans le milieu Ca^{2+} /0 soit dans le milieu 0/ Mg^{2+} . Les effets obtenus sur les thiamines et l'ACH seront comparés aux résultats obtenus dans les extraits de tissu entier (0/0), c'est-à-dire à l'état qui précédait l'homogénéisation.

RESULTATS

Les résultats exposés ici proviennent d'une seule Torpille, incluse dans le collectif précédent (Torpille 5, Tableau III.1.1.). Pour chaque point expérimental, 3 fragments de tissu sont analysés. C'est la seule expérience où toutes les combinaisons proposées ont été systématiquement explorées. Dans d'autres expériences, l'un ou l'autre des paramètres a été analysé séparément et les variations obtenues confirment les résultats présentés ici.

EFFETS SUR LE TISSU ENTIER.

Thiamine totale :

La modification des concentrations de CaCl_2 et de MgCl_2 dans le milieu extérieur ne crée pas de variation significative dans les taux de thiamine totale mesurés dans le tissu entier

(nmoles/g de Thia + esters-P) (voir plus loin, Tableau III.3.1).

Esters-P et ACh :

Quels sont les effets induits par ces modifications sur la répartition en thiamine et esters-P, exprimés en % de la thiamine totale ? Comment varie l'ACh totale du tissu, dans ces mêmes échantillons ?

Les résultats sont illustrés dans la figure III.3.1. Afin de simplifier l'analyse, les esters-P de la thiamine sont envisagés dans leur ensemble.

1. Variations des esters-P : d'une manière générale, nous constatons que plus le Ca^{2+} diminue dans le milieu extérieur, plus la phosphorylation de la thiamine est favorisée. En effet, cette réaction devient de plus en plus prononcée en passant du milieu Ca^{2+}/O au milieu O/Mg^{2+} . Inversement, en passant du milieu physiologique ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) à celui où tout le Mg^{2+} est remplacé par du Ca^{2+} (Ca^{2+}/O), il se produit une déphosphorylation des esters-P. Par rapport à la condition physiologique, c'est le remplacement du Ca^{2+} par le Mg^{2+} qui crée la phosphorylation la plus marquée. Dans cette expérience, la condition O/Mg^{2+} , comparée à celle O/O , produit un accroissement non significatif de la phosphorylation de la thiamine.
2. Variations de l'ACh totale : les taux d'ACh totale (nmoles/g) augmentent significativement dans les milieux Ca^{2+}/O et O/Mg^{2+} , comparativement au milieu physiologique. Cette

TABLEAU III.3.1

CONDITION	THIAMINE TOTALE (NMOLES/G)		
	TISSU ENTIER		HOMOGENAT
Ca ²⁺ / 0	30,1 ± 3,3	N.S	40,8 ± 3,6
*Ca ²⁺ / Mg ²⁺	22,1 ± 1,3	N.S	49 ± 11
0 / 0	28,4 ± 2,4	2 % < P < 5 %	42,5 ± 4,4
0 / Mg ²⁺	25,8 ± 6,1	P ≤ 5 %	52,5 ± 6,3

Taux de thiamine totale (Thia + E-P) en nmoles/g ($m \pm$ écart réduit), dosés dans des extraits de tissu entier et leurs homogénats, après incubation dans des milieux où la (Ca²⁺) et la (Mg²⁺) ont été modifiées. Tous ces milieux consistent en du tampon Torpille où les concentrations de Ca²⁺ et Mg²⁺ sont modifiées. La signification des symboles, pour chaque condition, est donnée dans "Matériel et Méthodes". *correspond au tampon physiologique normal.

FIG III 3. 1

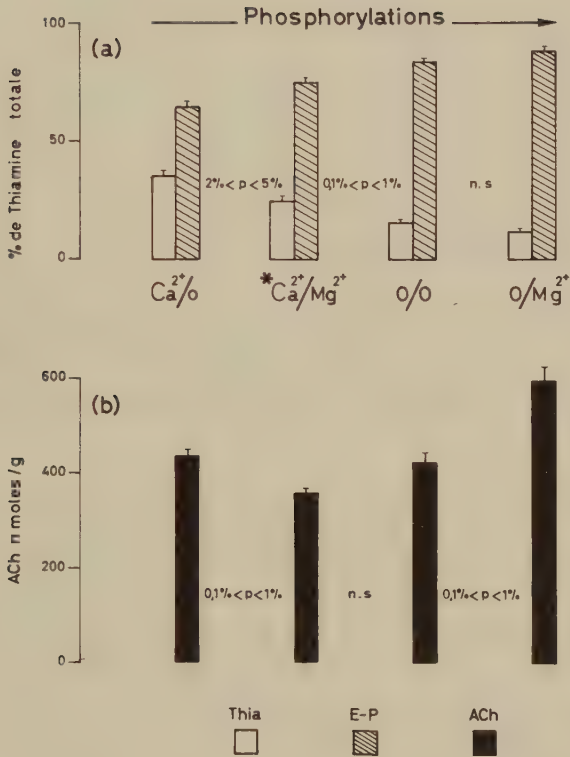


Figure III.3.1 : Variations de la concentration du Ca^{2+} et du Mg^{2+} dans le milieu d'incubation. La thiamine, ses esters-P et l'ACH totale sont dosés dans le tissu entier, directement extrait au TCA, après incubation de 2 heures dans différentes conditions du rapport Ca^{2+} / Mg^{2+} . (a) Répartition de la thiamine et de ses esters-P totaux (TMP + TPP + TTP), en % de la thiamine totale, dans chaque condition ; ($m \pm$ écart réduit, $n = 3$) ; (b) Taux d'ACH totale (nmoles/g) trouvée après incubation dans chaque condition. Les différents milieux d'incubation sont obtenus par des modifications du Ca^{2+} et du Mg^{2+} dans le tampon physiologique Torpille*. Les symboles correspondant à chaque condition sont indiqués dans "Matériel et Méthodes".

augmentation est toutefois beaucoup plus importante dans le milieu O/Mg^{2+} . En absence des 2 cations divalents, la différence n'est pas significative d'avec les témoins. De même, les conditions O/O et Ca^{2+}/O ne diffèrent pas significativement.

EFFETS DE L'HOMOGENEISATION.

Que se passe-t-il lorsque des fragments tissulaires, préalablement incubés dans les différentes conditions ci-dessus, sont homogénéisés dans ces mêmes milieux ?

Thiamine totale :

Les effets observés sur les taux de thiamine totale (nmoles/g Thia + esters-P) figurent dans le tableau III.3.1. Sur ce tableau sont comparées les teneurs dans les extraits de tissu entier et celles trouvées dans les homogénats. La dispersion des valeurs est généralement plus élevée dans les homogénats ; ceci pourrait être attribué à leur plus forte concentration saline, qui gênerait la migration électrophorétique et expliquerait ainsi la moins bonne reproductibilité au dosage de la thiamine et des esters.

Nous pouvons constater que les taux de thiamine totale, lors de l'homogénéisation, tendent généralement à augmenter. Un tel accroissement n'est pas significatif dans les conditions Ca^{2+}/O et Ca^{2+}/Mg^{2+} (condition physiologique). Par contre, les milieux O/O et O/Mg^{2+} , induisent une augmentation significative de la thiamine totale lors de l'homogénéisation. Cet effet présente une certaine analogie avec celui observé lors de la stimulation électrique.

Esters-P et ACh :

Comment se répartissent la thiamine et ses esters-P, lors de ces homogénéisations ? Quelle est la variation relative des 2 compartiments d'ACh ?

Les résultats sont illustrés dans la figure III.3.2. Seule la variation des esters-P, en % de la thiamine totale, y figure ; ces % rendent compte des réactions de phosphorylation et déphosphorylation, survenues lors des homogénéisations. Sur cette figure sont également indiqués les taux d'ACh liée et totale (nmoles/g), trouvées respectivement dans les homogénats et dans les extraits de tissu entier correspondant ; la taille du compartiment libre est estimée par différence.

1. Variation des esters-P : l'homogénéisation des fragments tissulaires dans le milieu $\text{Ca}^{2+}/0$ entraîne une diminution non significative du % d'esters-P ; donc la situation n'est pas modifiée par rapport au tissu entier incubé dans cette même condition.

L'homogénéisation dans le tampon physiologique ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) produit la phosphorylation déjà décrite précédemment chez plusieurs Torpilles.

L'homogénéisation en absence de Ca^{2+} et de Mg^{2+} (0/0) maintient constant le % d'esters-P, déterminé dans le tissu entier. Par contre, l'homogénéisation dans le milieu $0/\text{Mg}^{2+}$ entraîne une déphosphorylation significative des esters-P. Il est intéressant de constater que dans cet homogénat, les esters-P atteignent 76 % de la thiamine totale, c'est-à-dire une proportion égale à celle trouvée dans le tissu entier, incubé dans des conditions physiologiques.

FIG. III. 3. 2.

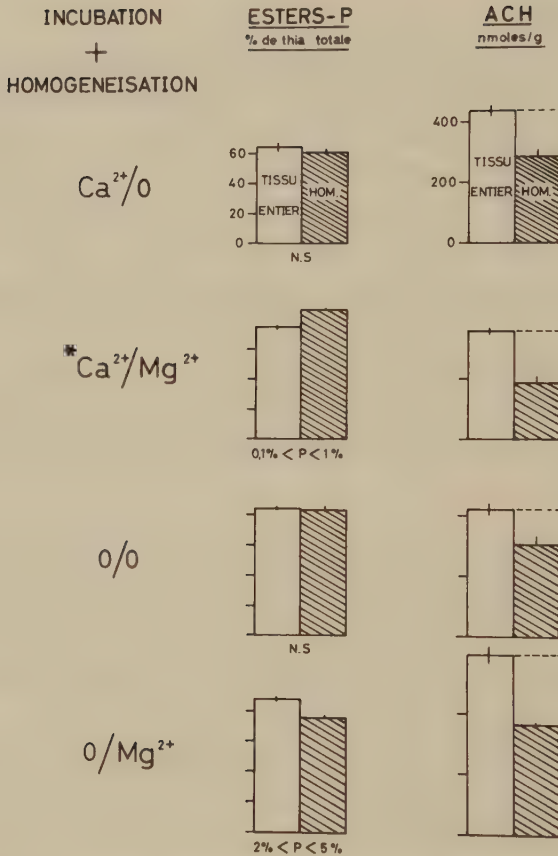


Figure III.3.2 : Homogénéisations des fragments tissulaires dans différentes conditions du rapport Ca^{2+}/Mg^{2+} extérieur. Les esters-P de la thiamine, exprimés en % de la thiamine totale, sont déterminés dans des homogénats de tissu préalablement incubé dans différentes conditions de Ca^{2+}/Mg^{2+} ; l'ACH, exprimée en nmoles/g, est dosée dans les mêmes échantillons. Les valeurs obtenues après homogénéisation sont comparées à celles déterminées dans les extraits de tissu entier incubé dans les mêmes conditions de Ca^{2+}/Mg^{2+} . Chaque valeur est une moyenne + écart réduit de 3 échantillons. □ : valeurs déterminées dans les extraits de tissu entier ; ▨ : valeurs trouvées dans les homogénats correspondant. En pointillé, sont indiquées les valeurs correspondant à l'ACH libre déterminée par différence entre l'ACH totale (tissu entier) et l'ACH liée (homogénat). Les symboles correspondant aux différentes conditions d'incubation et d'homogénéisation sont expliqués dans "Matériel et Méthodes". *Milieu physiologique normal.

Donc, la condition O/Mg^{2+} , qui dans le tissu entier favorisait la phosphorylation la plus forte (Figure III.2.1) produit lors de l'homogénéisation, un effet inverse de déphosphorylation des esters-P de la thiamine. Dans cette condition, la variation des esters-P entre "Tissu entier-Homogénat" présente une image en miroir de la variation "Tissu entier-Homogénat" constatée dans la condition physiologique (Ca^{2+}/Mg^{2+}).

2. Variation des deux compartiments d'ACh (Figure III.3.2) :
comparativement à l'homogénéisation dans les conditions physiologiques, où la proportion d'ACh liée équivaut à la proportion d'ACh dite "libre", toutes les autres conditions d'incubation puis d'homogénéisation, produisent un déséquilibre plus ou moins prononcé en faveur de l'ACh liée. L'augmentation la plus forte d'ACh liée, accompagnée d'une perte importante du compartiment libre, se manifeste lorsque les 2 cations divalents sont absents du milieu extérieur (O/O). Dans les deux autres conditions (Ca^{2+}/O et O/Mg^{2+}) le déséquilibre lié/libre est moins marqué. Nous pouvons considérer qu'en passant d'une condition d'homogénéisation à une autre, la disproportion entre les deux compartiments du transmetteur décroît dans le sens suivant : $O/O > Ca^{2+}/O > O/Mg^{2+}$. Or, l'accroissement de l'ACh totale, produit dans le tissu entier par ces différentes conditions de Ca/Mg, s'amenuisait dans un sens contraire, $O/Mg^{2+} > Ca^{2+}/O > O/O$.

3. Comparaison entre les variations des esters-P de la thiamine et celles de l'ACh : en résumé, au niveau du

tissu entier, le remplacement du Mg^{2+} par le Ca^{2+} dans le milieu extérieur, induit une déphosphorylation nette des esters-P de la thiamine. Inversement, le remplacement du Ca^{2+} par le Mg^{2+} produit l'effet contraire, à savoir une phosphorylation nette. A ce niveau, les 2 cations possèdent donc un effet antagoniste. En ce qui concerne l'ACh totale, ces deux cations semblent avoir un même effet en produisant une augmentation des taux de transmetteur. Toutefois le Mg^{2+} , en absence de Ca^{2+} , semble nettement plus puissant à cet égard.

Dans les homogénéisations, contrairement au tissu entier, la condition O/Mg^{2+} entraîne la déphosphorylation la plus importante des esters-P et les ramène à la proportion existant dans le tissu entier, placé dans la condition physiologique (Ca^{2+}/Mg^{2+}). Or, le remplacement du Ca^{2+} par le Mg^{2+} , qui crée une forte augmentation de l'ACh totale dans le tissu intact, tend, au moment de l'homogénéisation, à maintenir les deux compartiments du transmetteur dans des proportions assez égales, proches de la condition physiologique. Il y a donc, dans ce cas, (O/Mg^{2+}), une certaine analogie de comportement entre les esters-P et l'ACh.

CAS PARTICULIERS : EFFETS DU Ca^{2+} ET DU Mg^{2+} AJOUTES LORS DE L'HOMOGENEISATION.

Il nous a semblé intéressant, à partir des fragments préalablement privés de Ca^{2+} et de Mg^{2+} (condition O/O), d'étudier les effets dus à l'adjonction soit du Ca^{2+} soit

du Mg^{2+} lors de l'homogénéisation. Il faut rappeler que l'incubation puis l'homogénéisation dans la condition O/O entraînait :

- a. une augmentation du taux de thiamine totale (nmoles/g) ;
- b. aucune redistribution des esters-P et de la thiamine ;
- c. une augmentation apparente très importante de l'ACh "liée" par rapport à la "libre".

Thiamine totale :

Dans ces expériences, l'adjonction de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} lors de l'homogénéisation, n'a produit aucune augmentation supplémentaire du taux de thiamine totale (nmoles/g), qui se maintient à un taux moyen de 40 nmoles/g, dans les deux homogénats.

Esters-P et ACh :

1. Variation des esters-P : les résultats sont indiqués dans la figure III.3.3. L'adjonction de Ca^{2+} aussi bien que de Mg^{2+} , l'autre cation étant respectivement absent, produit lors de l'homogénéisation, une déphosphorylation significative des esters-P. Cette déphosphorylation est d'importance égale quel que soit le cation testé, et diminue les esters-P de 84 %, trouvés dans le tissu entier (O/O), à 76 % dans les deux homogénats. Or, dans le tissu entier et placé dans des conditions physiologiques, le 75 % de la thiamine totale est sous forme d'esters-P. Par conséquent, l'adjonction de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} à un tissu préalablement privé des deux ions, tend à ramener la proportion des esters-P à sa valeur physiologique.

FIG. III. 3. 3.

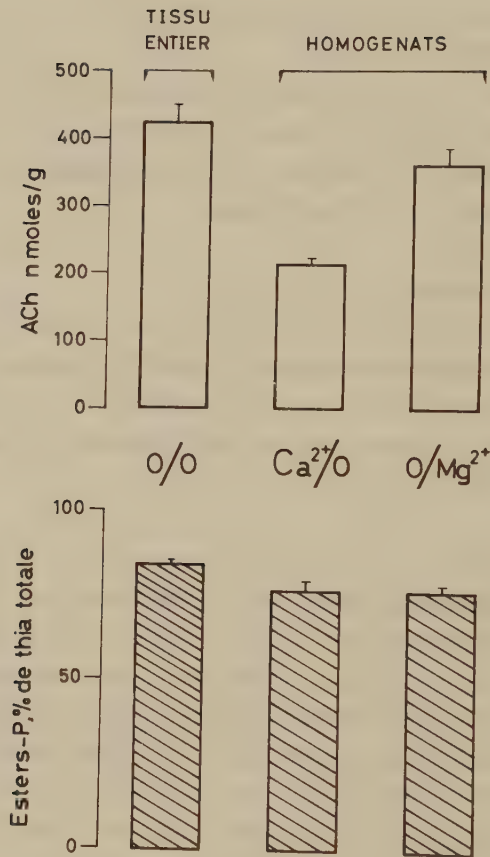


Figure III.3.3 : Effets du Ca^{2+} et du Mg^{2+} lors de l'homogénéisation. Les fragments tissulaires sont préalablement incubés pendant 2 heures dans un milieu exempt de Ca^{2+} et de Mg^{2+} (0/0) ; chaque homogénéisation est effectuée soit avec adjonction de Ca^{2+} soit de Mg^{2+} . Les taux d'esters-P de la thiamine, en % de la thiamine totale, trouvés dans ces homogénats sont comparés à ceux trouvés dans les extraits de tissu entier placé dans la condition 0/0. Le même procédé est appliqué aux valeurs de l'ACh, exprimées en nmoles/g et dosées dans les mêmes échantillons. Pour chaque condition, $n = 3$.

2. Variations des deux compartiments de l'ACh (Figure III.3.3) :
par rapport à l'homogénat en O/O, l'adjonction de Ca^{2+} diminue fortement la proportion d'ACh liée retrouvée après homogénéisation ; cette observation concorde avec les résultats obtenus par d'autres auteurs (Babel-Guérin, 1974 ; Israël et coll., 1977). Par contre, le Mg^{2+} accroît considérablement la proportion d'ACh liée, la libre devenant très faible. Le calcium semble donc indispensable au maintien du compartiment d'ACh disponible pour la libération. Donc, nous pouvons suggérer que dans ces conditions, l'homogénéisation en O/O ne produit qu'une destruction partielle de l'ACh libre, le processus étant achevé par l'adjonction de Ca^{2+} dans le milieu d'homogénéisation. Le Mg^{2+} s'oppose à l'action du Ca^{2+} en augmentant la quantité d'ACh protégée de l'action de l'ACHE.

DISCUSSION

La variation relative des compartiments libre et lié de l'ACh, sous l'effet d'une modification du rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ extracellulaire, est mise en évidence par l'homogénéisation du tissu. En ce qui concerne l'importance relative de la thiamine et de ses esters-P, il faut considérer deux variations : celle induite dans le tissu entier par un déséquilibre du rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ et celle, subséquente, provoquée par l'homogénéisation du tissu.

D'une manière générale, toute altération du rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ extérieur, qui induit une variation nette dans le % d'esters-P, ne produit qu'une faible variation relative

des 2 compartiments de l'ACh. Par contre, lorsque la proportion d'esters est maintenue constante, l'ACh liée semble beaucoup augmenter proportionnellement à la libre. Dans l'organe électrique, les phosphorylations et déphosphorylations des esters-P de la thiamine paraissent être modulées par les variations du calcium et magnésium extérieurs. Ces réactions enzymatiques pourraient, d'une certaine manière, participer au maintien de l'équilibre entre les deux compartiments du transmetteur.

L'ATP, dans la plupart des conditions où la thiamine se phosphoryle ou se déphosphoryle, semble toujours subir une réaction dans le sens contraire ; à savoir, lorsque les esters-P croissent, le taux d'ATP diminue, et inversement, lors d'une diminution des esters-P, l'ATP revient à sa valeur normale.

III.4 DISCUSSION

Les différentes conditions expérimentales auxquelles nous avons soumis le tissu électrogène, ont toutes créé des variations importantes de l'ACH ; ces résultats concordent en général avec ceux déjà décrits par plusieurs autres auteurs. Dans toutes ces expériences, les diverses thiamines (Thia et esters-P) ont également montré des changements marqués et significatifs. De plus, à chaque fois, nous avons conclu que le taux de phosphorylation ou déphosphorylation de la thiamine présentait une certaine relation, non seulement avec l'ACH, mais également avec l'ATP. Or, un lien métabolique ATP-esters-P paraît très probable, puisque l'ATP intervient directement dans le métabolisme de l'ACH.

La stimulation du tissu donne une image dynamique de la relation ACH-ATP-esters-P, les 3 variant apparemment en phase.

L'homogénéisation ainsi que les incubations dans des conditions non physiologiques du rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, présentent une image plutôt statique d'une telle relation ; schématiquement, toute diminution de l'ACH semble correspondre à une hydrolyse de l'ATP, mais à une phosphorylation de la thiamine.

IV

INCORPORATION DE LA THIAMINE EXOGENE

Il a été démontré par plusieurs auteurs (Sharma et Quastel, 1965 ; Rindi et Ventura, 1967) que la thiamine entre dans les cellules animales via un processus de transport actif.

Les expériences décrites ici ont pour but principal de démontrer que l'organe électrique de Torpille a la capacité d'incorporer et de métaboliser activement la thiamine exogène, donc qu'il possède les mécanismes enzymatiques spécifiques responsables de ces processus. A cet égard, les effets de l'acétate et de la choline, tous deux précurseurs de la synthèse de l'ACh dans ce tissu, sont intéressants pour l'étude d'une éventuelle relation entre le métabolisme de l'ACh et celui de la thiamine. L'incorporation active de la thiamine est révélée par sa phosphorylation en esters-P. Le phénomène analysé de la sorte est complexe puisqu'il englobe plusieurs mécanismes enzymatiques, à savoir le transport de thiamine proprement dit et ses différentes phosphorylations en TMP, TPP et TTP.

PRINCIPE.

L'incorporation de la $\left[(2-^{14}\text{C})\text{thiazole} \right]$ -Thiamine par des fragments d'organe électrique est estimé par sa phosphorylation en esters-P radioactifs. Ce principe est appliqué à l'étude de l'incorporation de la ^{14}C -Thiamine a) en fonction du temps d'incubation, b) en fonction de la concentration de thiamine externe, c) en présence de la choline et de l'acétate, tous deux précurseurs de l'ACh dans l'organe électrique de Torpille.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL.

La $[(2-^{14}\text{C})\text{-thiazole}]\text{-Thiamine}$ provient du "Radiochemical Center, Amersham". Sa radioactivité spécifique est de 14 mCi/mmole. Une solution mère, à 500 $\mu\text{Ci/ml H}_2\text{O}$ b.d. est préparée et conservée au congélateur.

Tous les comptages de la radioactivité sont effectués dans un compteur à scintillation Intertechnique. Le liquide à scintillation employé est de l'Instagel (Packard).

PROCEDE.

Toutes les incubations qui vont suivre sont faites à température ambiante (environ 22°C), dans le milieu physiologique Torpille, pH 7,4. Les solutions sont constamment oxygénées par un courant gazeux d'oxycarbonate (95 % O_2 ; 5 % CO_2).

Généralement 3 fragments tissulaires sont incubés dans 10 ml de milieu physiologique, additionné de ^{14}C -Thiamine ; ces échantillons doivent être de faible épaisseur et présenter entre eux une géométrie aussi proche que possible ; ceci sert à éviter une trop grande variabilité dans les résultats. A la fin de chaque incubation, le précurseur radioactif est éliminé du milieu extracellulaire par 4 lavages successifs de 30 minutes chacun, dans 100 ml de milieu physiologique Torpille, exempt de radioactivité.

Ces lavages, sauf mention spéciale, s'effectuent également à température ambiante et sous oxygénation constante. La radioactivité mesurée dans le milieu extérieur en cours de lavage, diminue selon une exponentielle, rapidement durant les 30 premières minutes, plus lentement après. Après 120 minutes de lavage, une radioactivité assez constante est atteinte dans le bain, indiquant qu'un équilibre s'est fait entre l'extérieur et l'intérieur du tissu. A ce moment le lavage est considéré comme suffisant.

Incorporation en fonction du temps d'incubation :

Nous avons choisi 3 durées d'incubation : 3, 6 et 22 heures. Pour chaque durée un bain d'incubation différent est employé. Pour l'incubation de 6 heures, la solution radioactive est renouvelée après 3 heures ; pour l'incubation de 22 heures, la solution est renouvelée après 6 heures. Dans chaque bain, la concentration initiale de ^{14}C -Thiamine est de $7,14 \mu\text{M}$, sans aucune adjonction de thiamine standard non radioactive ; la radioactivité spécifique (RAS) du bain est de $31'080 \text{ dpm/nmole}$ de thiamine. Après lavage du précurseur, les échantillons sont délicatement séchés et pesés, puis directement extraits au TCA 5 % selon les méthodes habituelles.

Incorporation en fonction de la concentration de thiamine externe :

Des concentrations de thiamine exogène allant de 10^{-5} M à $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ sont testées. Sauf celle à 10^{-5} M , toutes les autres concentrations sont obtenues avec un mélange de ^{14}C -Thiamine et de thiamine non radioactive. Les incubations

dans ces différentes solutions durent 3 heures. Après lavage de la radioactivité, les échantillons sont pesés et extraits au TCA.

Effets de l'acétate et de la choline sur l'incorporation :

Ces deux précurseurs de l'ACh sont ajoutées aux bains d'incubation contenant le mélange ^{14}C -Thia + Thia non radioactive, soit séparément soit ensemble, à une concentration finale de 10^{-3} M. Dans chaque milieu la concentration de thiamine est de 10^{-4} M et la RAS de 6'500 dpm/nmole. Les durées d'incubation sont de 6 heures. Dans ce cas, l'élimination du précurseur radioactif s'effectue à 5°C , d'abord par 3 lavages successifs, de 30 minutes chacun, dans 100 ml de milieu physiologique, puis par un 4e lavage dans 120 ml, durant 6 heures. Les échantillons, après pesée, sont extraits.

Estimation de la radioactivité totale incorporée :

Après centrifugation des extraits TCA, et avant le lavage à l'éther, un aliquot de 20 μl de chaque surnageant acide est compté dans 5 ml d'Instagel. La radioactivité totale incorporée (^{14}C -Thia + ^{14}C -esters-P) est calculée en nmoles de ^{14}C -Thiamine exogène incorporée par gramme de poids humide, de la manière suivante :

$$\frac{\text{dpm} / \text{ml extrait}}{\text{g/ml}} \times \frac{1}{\text{RAS (dpm/nmole)}}$$

Afin de déterminer si une partie importante de radioactivité totale reste associée au culot protéique, celui-ci est

dissous dans 1 ml de NaOH 1 M, à 50°C, pendant 2 heures. Après neutralisation par 1 ml de HCl 1 N, ces échantillons sont comptés dans 10 ml d'Instagel. En moyenne 3 à 5 % de la radioactivité totale mesurée dans le surnageant, est perdue avec le culot protéique. Cette perte est considérée comme peu importante et une seconde extraction du culot ne s'avère pas nécessaire. Après lavage des extraits TCA par l'éther, 20 µl de solution sont comptés ; ceci permet d'estimer à 20 % les pertes moyennes réalisées lors de cette opération. Une multiplication par un facteur correctif de 1,2 à 1,3 sera donc introduite lors du calcul du taux d'esters-P radioactifs formés.

Estimation de la ^{14}C -Thia et des esters-P radioactifs formés :

La thiamine précurseur est séparée de ses esters-P par extraction sous forme de sel de tétraphénylborate (TPB). Cette méthode d'extraction appliquée à l'ACh et autres amines quaternaires, a été décrite en détail par Fonnum (1966 ; 1968 ; 1969). Le TPB sous forme de sel de sodium est assimilable à une résine échangeuse de cations. Il a donc la capacité de former des complexes avec la thiamine en solution aqueuse, qui s'y lie par son groupe ammonium quaternaire. Le complexe ainsi formé est insoluble dans l'eau mais soluble dans certains solvants organiques, notamment l'éthylbutylcétone (EBC). Cette technique de séparation permet d'analyser rapidement une grande série d'échantillons. Le protocole appliqué est donc le suivant : à 1 ml de chaque extrait lavé à l'éther, sont ajoutés 2 ml de tampon phosphate de Na 10 mM, pH 7,4 ; le pH atteint est alors de 7 à 7,2. A ces solutions sont alors ajoutés

2ml d'EBC contenant 20 mg de TPBNa. Le mélange est fortement agité, 4 x 15 secondes, sur vortex. Après séparation de la phase aqueuse et organique par centrifugation, la couche organique supérieure, contenant le complexe TPB-Thiamine, est transvasée dans des tubes à centrifuger où est ajouté 1 ml de HCl 1 N. La phase aqueuse restante que nous désignerons par "solution I", renferme les esters-P radioactifs de la thiamine. Ce nouveau mélange EBC-HCl est vigoureusement agité puis centrifugé ; la phase organique est éliminée par aspiration et la phase aqueuse acide contient la thiamine précurseur qui a été dissociée du TPB par le traitement à 1'HCl ; cette seconde phase aqueuse sera désignée par "solution II".

Des aliquots de 1 ml de "solutions I" ainsi que 0,5 ml de "solutions II" neutralisées par du NaHCO_3 , sont comptés après adjonction de 10 ml de liquide à scintillation. Les radioactivités (dpm/ml) obtenues dans chacune de ces solutions sont rapportées à 1 ml d'échantillon initial ; ces valeurs permettent alors de calculer les nmoles/g de ^{14}C -Thiamine incorporée, soit sous forme de thiamine précurseur, soit sous forme de ses esters-P. La somme de ces deux données indique quelle est la récupération, en % de la radioactivité totale. Généralement, nous obtenons une récupération satisfaisante de 80 à 90 %.

Contrôles : Afin de déterminer l'efficacité de la séparation réalisée par l'extraction au TPBNa, les tests suivants sont réalisés :

- A. 3 quantités croissantes de ^{14}C -Thiamine (2,5, 25 et 250 nCi, équivalant respectivement à 0,18, 1,8 et 18 nmoles)

sont ajoutées parallèlement à 1 ml d'H₂O b.d. et à 1 ml d'extrait tissulaire non radioactif. L'extraction au TPBNa est effectuée de manière identique aux échantillons inconnus. Le comptage de la radioactivité montre que seulement le 1 à 3 % de la ¹⁴C-Thia totale à extraire est resté dans la "solution I", alors que le 80 % de cette radioactivité est retrouvé dans la "solution II" ; ces valeurs sont identiques en absence aussi bien qu'en présence d'extraits tissulaires. Dans ce cas, nous pouvons conclure que la quasi-totalité de la thiamine est extraite par le TPBNa et que la radioactivité restant dans la "solution I" ne provient pas d'une contamination par de la thiamine précurseur.

B. Il reste donc à prouver que la radioactivité présente dans la "solution I" correspond bien, dans nos extraits tissulaires, aux esters-P radioactifs formés ; d'autre part, il faut démontrer que la "solution II" du précurseur radioactif n'est pas contaminée par ces mêmes esters. Pour ce, un mélange de standards Thia + esters-P non radioactifs, est ajouté simultanément aux "solutions I et II". Celles-ci sont alors concentrées à sec par évaporation sous vide ; après dissolution des résidus dans 0,2 ml d'H₂O b.d., 20 µl de chaque solution sont soumis à une électrophorèse à haute tension, selon les méthodes habituelles. L'opération de concentration est nécessaire, d'une part pour permettre de détecter une éventuelle contamination de la "solution II" par les esters-P radioactifs ; d'autre part, la radioactivité généralement contenue dans la "solution I" est assez faible (200 à 400 cpm/ml) ; de ce fait, les petits volumes

applicables à l'électrophorèse ne permettraient pas de détecter des pics significatifs de radioactivité, correspondant à chaque ester-P. Dans chaque cas (sol. I et II) la fluorescence des standards internes révèle une migration assez satisfaisante de la thiamine, par contre, en raison de la forte concentration saline, la résolution entre les esters-P est mauvaise. Dans la "solution I", le 80 % de la radioactivité appliquée se retrouve dans la zone de migration des esters-P standards. Aucune radioactivité n'est présente dans le spot de thiamine. Dans la "solution II, le 95 % de la radioactivité migre avec la thiamine standard.

En conclusion, ces tests indiquent que la séparation par la technique au TPBNa est satisfaisante et que la radioactivité présente dans la "solution I" peut être attribuée aux esters-P formés.

Dans toutes ces expériences, les témoins sont obtenus comme suit : des fragments tissulaires sont parallèlement incubés dans le tampon physiologique Torpille exempt de radioactivité ; juste avant l'extraction au TCA, de la ^{14}C -Thiamine est ajoutée à chaque échantillon de manière à obtenir environ 500'000 cpm/ml d'extrait (c'est-à-dire environ 33 nmoles/ml de thia radioactive). ces échantillons témoins sont alors soumis aux mêmes traitements que les inconnus. Pour cette quantité de thiamine à extraire, environ 5 fois supérieure à celle normalement présente dans les extraits tissulaires, la quantité de radioactivité restant dans la "solution I" des esters-P est très faible ; cette valeur sera déduite pour le calcul du taux d'esters-P formés.

RESULTATS

INCORPORATION EN FONCTION DE LA DUREE D'INCUBATION.

Les résultats obtenus après 3, 6 et 22 heures d'incubation sont moyennés pour chaque durée, sur 3 extraits tissulaires d'une même Torpille. Les lavages du précurseur radioactif présentent dans chaque cas, une diminution exponentielle identique.

Le tableau IV.1 montre l'effet des différents temps d'incubation sur l'incorporation de la ^{14}C -Thiamine totale (Thia + esters-P) ainsi que sur sa phosphorylation. La somme de ^{14}C -Thia et Esters-P radioactifs indique une récupération moyenne de 95 % de la radioactivité totale à extraire. Entre 3 et 6 heures d'incubation, aucune différence significative ne se manifeste, que ce soit dans le taux de ^{14}C -thiamine totale ou dans les ^{14}C -esters-P formés. Toutefois, après 22 heures d'incubation il s'est produit une augmentation significative de la phosphorylation donc, de l'incorporation. Le pourcentage de thiamine totale convertie en esters-P radioactifs atteint 24 %, 28 % et 36 % respectivement après 3, 6 et 22 heures. Pour cette concentration de thiamine exogène (7,14 μM), la vitesse à laquelle cette phosphorylation a lieu rend compte d'un mécanisme "saturable" en fonction du temps ; en effet, durant les 3 premières heures d'incubation, la phosphorylation procède à 0,04 nmoles/g/h, puis marque un arrêt entre 3 et 6 heures. Après 22 heures, une vitesse de phosphorylation de 0,012 nmoles/g/h est atteinte.

TABLEAU IV.1

DUREE D'INCUBATION	¹⁴ C-THIAMINE INCORPOREE (NMOLES/G)	
	TOTALE	ESTERS-P
3 H	0,510 ± 0,003	0,12 ± 0,03
6 H	0,48 ± 0,07	0,14 ± 0,01
22 H	0,73 ± 0,03	0,26 ± 0,01

Entrée et métabolisation de ¹⁴C-Thiamine, en fonction du temps. Les échantillons sont incubés pendant les durées indiquées, à température ambiante, et sous oxygénation constante. La concentration initiale de ¹⁴C-Thiamine est de 7,14 μ M, la RAS étant de 31'080 dpm/nmole. La radioactivité totale incorporée est déterminée dans les extraits TCA, avant le lavage à l'éther. La récupération de la radioactivité totale (Thia + E-P) après extraction au TPBNa, atteint en moyenne 95 %. Chaque valeur est une moyenne $\pm$ écart réduit de 3 échantillons.

INCORPORATION EN FONCTION DES CONCENTRATIONS DE THIAMINE EXOGENE.

Les radioactivités totales incorporées, pour chaque concentration de thiamine, figurent dans le tableau IV.2. Après extraction au TPBNa, la récupération du ^{14}C total atteint 90 %.

Les concentrations de thiamine externe, choisies ici, recouvrent un large intervalle, allant de 10^{-5} à $1,84 \times 10^{-3}$ M. L'incorporation de la radioactivité totale en fonction de ces différentes concentrations croît d'une manière linéaire (Tableau IV.2). La dispersion des valeurs est plus importante pour les fortes que pour les faibles concentrations du précurseur.

La quantité d'esters-P formés (nmoles/g) augmente également en fonction de la concentration externe du précurseur, mais d'une manière non linéaire (Figure IV.1). Une saturation du système semble se manifester entre 5×10^{-4} M et 10^{-3} M de thiamine externe. Lorsque l'incorporation est exprimée en nmoles/g de ^{14}C -esters-P, un ${}_{\text{app}}K_m$ de $4,8 \times 10^{-4}$ M ainsi qu'un V_{max} de 4 nmoles/g peuvent s'estimer d'après la représentation de Lineweaver-Burk. Ces valeurs doivent être considérées comme très apparentes, puisqu'elles proviennent en fait de plusieurs mécanismes enzymatiques, à savoir, le transport transmembranaire de la thiamine ainsi que ses différentes phosphorylations en esters-P.

En conclusion, la thiamine totale entre dans le tissu par diffusion simple. La phosphorylation, témoin de la métabolisation de la vitamine par le tissu, présente un processus saturable, ne concernant qu'une petite fraction

TABLEAU IV.2

CONCENTRATION INITIALE DE THIAMINE	^{14}C -THIAMINE TOTALE INCORPOREE NMOLES/G
10^{-5} M	0,52 $\pm$ 0,03
$9,2 \times 10^{-5}$ M	5,21 $\pm$ 0,30
$4,6 \times 10^{-4}$ M	24,70 $\pm$ 0,96
$9,2 \times 10^{-4}$ M	48,9 $\pm$ 6,1
$1,84 \times 10^{-3}$ M	89,1 $\pm$ 13,6

Incorporation de la ^{14}C -Thiamine en fonction des différentes concentrations externes de ^{14}C -Thia + Thia-HCl. L'incubation dure 3 heures à température ambiante. La radioactivité totale incorporée est déterminée dans des aliquots d'extraits TCA, avant lavage à l'éther. Les valeurs indiquées sont des moyennes $\pm$ écart réduit de 3 extraits.

FIG. IV. 1.

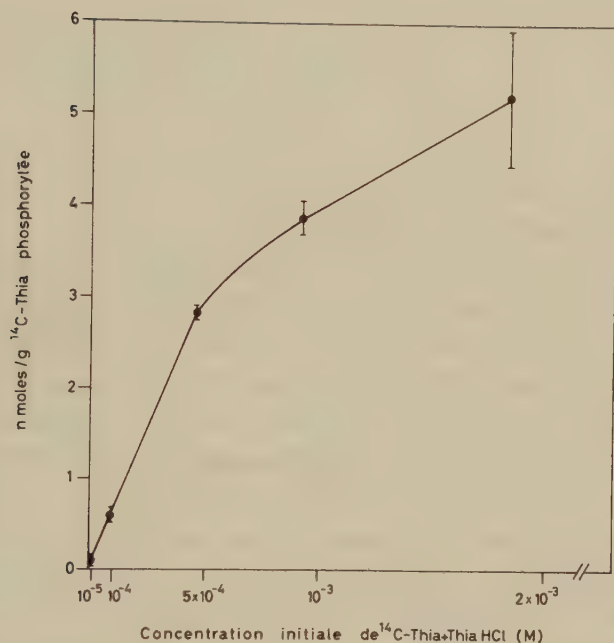


Figure IV.1 : Incorporation et phosphorylation de la ^{14}C -thiamine exogène en fonction de sa concentration dans le milieu d'incubation. Les esters-P radioactifs formés sont déterminés dans la phase aqueuse après séparation de la thiamine précurseur par la méthode d'extraction au TPBNa (voir "Matériel et Méthodes"). Pour les concentrations croissantes de ^{14}C -Thiamine exogène, la RAS des solutions d'incubation diminue dans le sens suivant : 33'209, 6'149, 1'199, 610 et 597 dpm/nmoles. En ordonnées : nmoles/g de ^{14}C -Thiamine phosphorylée, moyenne $\pm$ écart réduit de 3 échantillons d'une même Torpille. Pour chaque concentration de Thiamine exogène l'incubation des fragments tissulaires dure 3 heures, à température ambiante.

de la thiamine totale retenue. D'après les paramètres cinétiques, l'incorporation de thiamine ainsi que sa phosphorylation, se révèlent comme des processus apparemment lents.

EFFETS DE LA CHOLINE ET DE L'ACETATE SUR L'INCORPORATION.

L'organe électrique de Torpille a la propriété d'incorporer la choline et l'acétate externes et de les utiliser avec la même efficacité pour la synthèse de l'ACh (Israël et Tucek, 1974). Ces deux précurseurs de l'ACh interfèrent-ils avec l'incorporation de la thiamine exogène ?

Les résultats obtenus, provenant d'une seule Torpille, figurent dans le tableau IV.3. La différence entre la radioactivité totale incorporée et les esters-P formés correspond à la ^{14}C -Thiamine incorporée mais non estérifiée.

Dans les conditions d'incubation employées, les concentrations d'acétate ou de choline se trouvent dans un rapport 10 : 1 avec la concentration de ^{14}C -Thiamine. La présence d'acétate 10^{-3} M seul, n'entraîne aucune modification de la radioactivité totale retenue dans le tissu après lavage. Par contre, dans les milieux d'incubation additionnés de choline (10^{-3} M) la radioactivité totale incorporée augmente très significativement ($0,1 \% < p < 1 \%$) par rapport aux témoins. Cet effet paraît provenir uniquement de la choline et n'est pas significativement modifié par l'adjonction d'acétate. Comparativement, aux témoins, les nmoles/g de ^{14}C -Thiamine incorporée dans les esters-P, montrent une augmentation significative ($2 \% < p < 5 \%$) en présence d'acétate 10^{-3} M. En présence de choline, le taux de ^{14}C -esters-P formés tend à augmenter, bien que non significativement. Ceci pourrait signifier que la choline

TABLEAU IV.3

SUBSTANCE AJOUTEE	NMOLES/G ^{14}C -THIA INCORPOREE	
	TOTALE	ESTERS-P
0	8,07 $\pm$ 0,25	3,17 $\pm$ 0,1
ACETATE 10^{-3} M	7,86 $\pm$ 0,74	4,48 $\pm$ 0,44
CHOLINE 10^{-3} M	17,27 $\pm$ 1,5	4,04 $\pm$ 0,60
CHOLINE 10^{-3} M, ACETATE 10^{-3} M	16,9 $\pm$ 1,2	3,96 $\pm$ 0,29

Effets de la choline et de l'acétate sur l'incorporation de ^{14}C -Thiamine. L'incubation des fragments tissulaires, en présence ou en absence de substance ajoutée, dure 6 heures, à température ambiante, avec une concentration initiale en ^{14}C -thiamine + Thia-HCl de 10^{-4} M. La récupération de la radioactivité totale (Thia + E-P), après extraction au TPBNa, est de 90 %. m $\pm$ écart réduit, n = 3.

a d'une certaine façon, augmenté le transport transmembranaire de la thiamine exogène.

Lorsque ces deux substances sont ajoutées simultanément dans le milieu d'incubation, seuls les effets de la choline se manifestent et ne sont en rien modifiés par la présence de l'acétate. De plus, ce dernier n'exerce plus aucune action sur le taux de phosphorylation, qui, exprimé en nmoles/g d'esters-P formés, ne présente pas de différence significative d'avec les témoins.

En conclusion, la choline et l'acétate exogènes paraissent tous deux intervenir dans les mécanismes d'incorporation de la thiamine ; leurs points d'impact semblent toutefois différer ; la choline agirait plutôt sur les mécanismes de transport alors que l'acétate influencerait plutôt les réactions de phosphorylation.

DISCUSSION

L'incorporation de thiamine exogène par l'organe électrique de Torpille est étudiée en incubant des fragments tissulaires dans le milieu physiologique additionné de $[(2-^{14}\text{C})\text{thiazole}]$ -Thiamine. La formation d'esters-P radioactifs témoigne non seulement d'un transport transmembranaire de la vitamine mais également de la présence dans ce tissu des enzymes spécifiques à sa phosphorylation en TMP, TPP et TTP. Les résultats obtenus sont complexes puisqu'ils résultent de plusieurs processus enzymatiques. Le transport actif de la thiamine, à lui seul,

est difficile à analyser au niveau du tissu entier. En effet, malgré les lavages apparemment efficaces du précurseur, une partie non négligeable de celui-ci subsiste très probablement dans l'important volume représenté par l'espace extracellulaire (72 % du volume total) ; ce dernier est occupé par un réseau de mucopolysaccharides qui, par leurs charges négatives pourraient lier une certaine quantité de la thiamine exogène, par la charge positive de son ammonium quaternaire. Le taux de phosphorylation en fonction du temps d'incubation, pour une concentration de 10 μ M de thiamine exogène, semble indiquer que le phénomène transport-phosphorylation, présente une "saturation" en cours du temps. Apparemment des différences significatives dans la phosphorylation ne sont détectables que pour des Δt importants. En fonction des différentes concentrations de ^{14}C -Thiamine, l'estimation du taux d'esters-P radioactifs formés (nmoles/g) indique une cinétique apparemment saturable. Un K_m apparent pour le phénomène global a été estimé entre 5×10^{-4} et 10^{-3} M, ce qui peut paraître très élevé. Comparativement, une étude réalisée sur des tranches minces de cerveau, a permis de déterminer un K_m apparent de $3,6 \times 10^{-7}$ M pour le transport actif de la thiamine (Nose et coll., 1976). Il faut noter que dans l'organe électrique il est très difficile de déterminer quelle est la concentration exacte de thiamine à travers tout le fragment tissulaire, après incubation et lavage. Par exemple, Dunant et coll. (1972) ont démontré que de la choline radioactive exogène s'incorporait beaucoup plus fortement à la périphérie qu'au centre de fragments tissulaires épais, incubés pendant 1 heure dans ce précurseur de l'ACH. D'une manière générale, ce tissu électrogène présente un métabolisme lent ; par exemple, la formation d'ACH radioactive, à partir

de l'un de ses précurseurs, n'atteint, à la valeur du $V_{\max}$ (1 mM), que le 10 % du taux d'ACh totale endogène. Ce résultat est valable pour le tissu entier tout comme pour les synaptosomes isolés.

Les effets de la choline et de l'acétate, tous deux précurseurs efficaces de l'ACh, soulèvent plusieurs observations :

- a. la comparaison des effets individuels de chacune de ces substances, tant sur la radioactivité totale incorporée que sur la phosphorylation, indiquent que, dans l'organe électrique, le transport de la thiamine n'est pas couplé à sa phosphorylation. Plus précisément, une augmentation du taux de phosphorylation n'entraîne pas une augmentation du transport transmembranaire de la thiamine. Selon certains auteurs, le transport de la thiamine dans le cerveau, ne serait pas couplé à sa phosphorylation (Sharma et Quastel, 1965 ; Spector, 1976) ;
- b. les effets conjugués de l'acétate et de la choline tendent à montrer que l'acétate n'a aucune action sur le transport de la thiamine ; en effet, si c'était le cas, il accentuerait encore les effets de la choline. De même, la choline et l'acétate ne produisent aucun effet additif sur la phosphorylation. Il est actuellement difficile d'affirmer que l'augmentation de la ^{14}C -Thiamine totale retenue dans le tissu est réellement due à un effet spécifique direct de la choline. Nous pouvons exclure un système de transport commun pour ces deux amines quaternaires. L'augmentation du taux d'esters-P formés en présence d'acétate, et peut-être de choline, pourrait suggérer une certaine relation entre la thiamine et le métabolisme

de l'ACh dans ce tissu. L'acétate, précurseur de l'ACh, pourrait être capté par les terminaisons nerveuses, via un système enzymatique membranaire utilisant un ester-P de la thiamine comme cofacteur. A cet égard, la TPP, ou cocarboxylase, cofacteur de plusieurs réactions de décarboxylation, agit en cours de réaction, en liant des groupes acétyles. Cet ester pourrait donc intervenir au niveau des terminaisons nerveuses, comme transporteur de l'acétate exogène ; de ce fait, ce précurseur de l'ACh stimulerait la phosphorylation de la thiamine, nécessaire à son transport.

V

EFFETS DE LA THIAMINE EXOGENE SUR LE
METABOLISME DE L'ACH

V.1 EFFETS DE LA THIAMINE ET ANTIMETABOLITES :

A. SUR LA REPONSE ELECTROPHYSIOLOGIQUE

B. SUR LA LIBERATION DE L'ACH.

L'oxythiamine et la pyrithiamine sont des antimétabolites synthétiques de la thiamine, qui agissent par analogie de structure, en déplaçant la vitamine de son site d'action (Cerecedo et coll., 1951). La thiamine peut réverser complètement leurs effets. L'oxythiamine a été décrite comme n'ayant aucune action sur l'excitation nerveuse ; elle est connue pour inhiber les enzymes nécessitant la TPP (cocarboxylase) comme cofacteur. La pyrithiamine, par contre, semble avoir un effet électrophysiologique important, mais aucune action sur les enzymes à TPP. Plusieurs auteurs ont décrit les effets de ces deux antimétabolites, essentiellement au niveau des phénomènes d'excitation et de propagation de l'influx nerveux (Kunz, 1956 ; von Muralt, 1958 ; Arnett et Cooper, 1965).

Des méthodes électrophysiologiques et radiochimiques nous permettent de quantifier les effets de la thiamine et de ses 2 antimétabolites les plus connus, l'oxythiamine et la pyrithiamine (Figure V.1.1), au niveau de la transmission synaptique.

FIG. V. 1. 1.

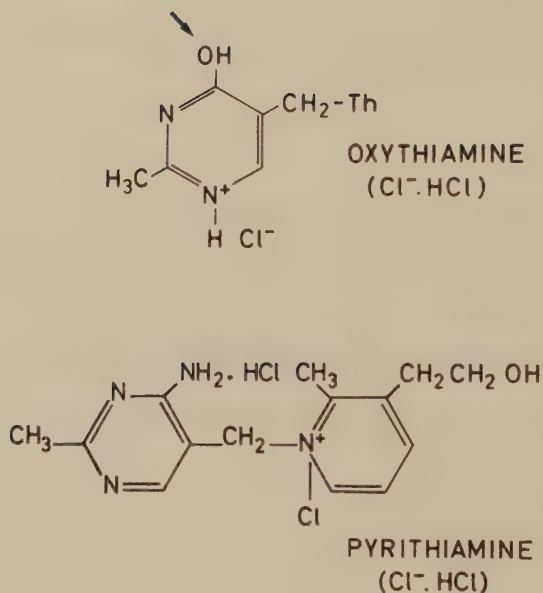


Figure V.1.1 : Structure chimique de l'oxythiamine et de la pyrithiamine. L'oxythiamine, antimétabolite de la thiamine, correspond à la molécule de thiamine où le groupe NH₂, en position 6' du noyau pyrimidique, est remplacé par un groupe OH. (Th : noyau thiazole de la thiamine),

Dans la pyrithiamine, également antimétabolite, le noyau de la thiamine est remplacé par un noyau 2-méthyl-3-(2-hydroxy-éthyl) pyridine.

Principe.

A. Des fragments d'organe électrique sont superfusés pendant 1 à 2 heures avec le tampon physiologique Torpille, additionné, soit de thiamine, soit de l'un de ses anti-métabolites, oxythiamine ou pyrithiamine. En cours de superfusion, la réponse électrophysiologique est testée en stimulant les prismes par des pulses uniques, en champ électrique, séparés par d'assez longs intervalles de temps.

B. Après marquage du tissu par incubation dans la choline et l'acétate radioactifs, isotopiquement différents, les fragments tissulaires, maintenus sous superfusion constante, sont stimulés répétitivement en champ. La radioactivité provenant de l'ACH libérée, est comptée dans le superfusat, avant et en cours de stimulation. Les effets de la thiamine et de l'oxythiamine sur la libération sont testés par adjonction de ces substances dans le milieu de superfusion, une heure avant le début de la stimulation.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL.

L'oxythiamine est un don du Dr. Bermond (Hoffman-La Roche). La pyrithiamine est fournie par Sigma. Les substances radioactives sont obtenues du "Radiochemical Center, Amersham, UK" ; ce sont : (1-¹⁴C)-Acétate, RAS 60,2 mCi/mmole ; (1-³H)-Acétate, 5 Ci/mmole ; (2-méthyl¹⁴C)-Choline, 52 mCi/mmole ; (2-méthyl³H)-Choline, 6,4 Ci/mmole.

PROCEDE.

Stimulations :

Dans toutes les expériences qui vont suivre, les échantillons, radioactifs ou non, et comportant 1 à 2 prismes, sont stimulés en champ, au moyen d'électrodes de Pt. parallèles aux prismes. Le montage employé a déjà été décrit en détail au Chapitre III. La superfusion constante des fragments tissulaires s'effectue à 1 ml/min, avec le tampon physiologique Torpille, additionné ou pas de la substance à tester.

Dans toutes ces expériences, un test initial de la réponse électrophysiologique est obtenu en stimulant les prismes par un seul stimulus de 60-110 V, et d'une durée de 0,5 à 0,8 msec. Il en résulte généralement un potentiel postsynaptique de l'électroplaque, d'une amplitude allant de 0,2 à quelques volts, selon les échantillons. Après ce test, les fragments tissulaires sont laissés au repos, pendant 60 minutes, sous superfusion constante, ce afin de permettre une atténuation des effets dus à cette première stimulation. Selon le type d'expérience, les prismes sont excités soit par un pulse unique supramaximal, de 110-180 Volts et d'une durée de 1 msec, soit par une stimulation répétitive, supramaximale (10 Hz, pendant 3 minutes).

A. EFFETS DE LA THIAMINE EXOGENE ET ANTIMETABOLITES SUR LA REPONSE ELECTROPHYSIOLOGIQUE.

Soit la thiamine, ou l'oxythiamine ou la pyrithiamine, sont ajoutées au milieu de superfusion, dans différentes concentrations finales. Après les 60 minutes de repos sous superfusion constante en tampon physiologique, ces différentes substances sont ajoutées. A ce moment, un premier stimulus est donné aux prismes ; la réponse électrophysiologique obtenue correspondra au temps $t = 0$. De ce fait, chaque fragment servira de son propre témoin initial. La superfusion avec ces différentes substances va se poursuivre pendant 2 heures, au cours desquelles, les prismes recevront un stimulus unique, toutes les 15 ou 30 minutes. A chaque stimulation, la réponse électrophysiologique est enregistrée sur un oscilloscope et photographiée. L'expérience est répétée de la sorte, le nombre de fois nécessaire pour obtenir le nombre d'échantillons voulus, pour chaque substance testée (2 à 5 fragments).

Dans toutes ces expériences, des échantillons témoins sont superfusés uniquement avec le tampon physiologique Torpille, et stimulés de la même manière que les tests. Ceci permet d'analyser l'évolution de la réponse électrophysiologique normale, pour de longues durées de superfusion.

ANALYSE DE LA REPONSE ELECTROPHYSIOLOGIQUE.

L'effet de chacune des substances testées, au cours du temps, est analysé en déterminant la surface sous la courbe

du potentiel d'électroplaque. L'enregistrement photographique des potentiels obtenus à chaque intervalle de temps (15 à 30 minutes), est décalqué sur papier, découpé et la surface sous la courbe est déterminée par pesée. Les surfaces sont alors exprimées en pour-cent de la surface initiale, correspondant au temps $t = 0$,

B. LIBERATION DE L'ACH ; EFFETS DE LA THIAMINE ET DE L'OXY-THIAMINE.

Les fragments tissulaires sont excisés de dimensions aussi semblables que possible ; leur poids est généralement de 0,2 à 0,4 g. Le tissu est marqué par incubation dans le tampon physiologique contenant les 2 précurseurs radioactifs de l'ACH. Indifféremment de la ^{14}C -Choline et du ^3H -Acétate, ou de la ^3H -Choline et du ^{14}C -Acétate peuvent être fournis au tissu. Le plus souvent nous avons utilisé de la ^3H -méthyl-Choline (5 $\mu\text{Ci/ml}$) et du ^{14}C -Acétate (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$) à la même concentration de 8,4 μM . Lorsque le but de l'expérience est uniquement de comparer les quantités de l'ACH radioactive libérée dans les conditions normales, avec celles obtenues en présence de thiamine et d'oxythiamine, le tissu est marqué avec un seul des 2 précurseurs radioactifs.

L'incubation dure généralement 4 heures, à 20°C , et s'effectue sous courant constant d'oxycarbonate. En moyenne, 15 à 20 fragments sont incubés dans 80 ml de solution. Les précurseurs radioactifs sont ensuite éliminés du milieu extracellulaire, d'abord par 6 lavages successifs, à 7°C ,

chacun de 30 minutes, dans 100 ml de tampon physiologique exempt de radioactivité ; après quoi, les échantillons sont maintenus durant une nuit dans 300 ml de tampon, à 7°C. Tous les lavages sont également effectués sous oxygénation constante ; la basse température diminue le métabolisme de l'ACh au cours des lavages.

Les prismes ainsi marqués sont alors installés pour la stimulation. Après le premier test de la réponse électrophysiologique, suivi de la période de 60 minutes de repos, les milieux de superfusion contenant la thiamine ou l'oxythiamine, sont appliqués pendant 60 minutes supplémentaires. Les échantillons témoins sont traités de même, mais sont constamment maintenus en tampon physiologique normal. Après cette heure de superfusion, le superfusat est récolté dans des fioles de comptage de la manière suivante : dans la minute qui précède la stimulation, le superfusat radioactif est collecté dans 3 fioles, à raison de 4 gouttes par fiole. La radioactivité ainsi mesurée rend compte de la libération du transmetteur, au repos. La stimulation répétitive est alors appliquée au moment où la première goutte de superfusat tombe du tissu dans le 4ème flacon de comptage. Pendant les 3 minutes de stimulation répétitive, le superfusat est récolté au même rythme qu'au repos, c'est-à-dire 3 fioles/minute. La radioactivité dans chaque fiole est comptée après adjonction de 5 ml de liquide de scintillation (Instagel).

ESTIMATION DE L'ACh RADIOACTIVE LIBEREE.

Les dpm/g de chaque précurseur, sont calculés selon les méthodes habituelles du double marquage ^3H - ^{14}C .

Afin de faciliter les comparaisons entre les divers marqueurs et les différentes conditions testées, les valeurs sont exprimées en pmoles/min/g libérées, au repos et durant l'activité ; celles-ci se calculent en divisant les dpm/g de chaque précurseur (^{14}C ou ^3H) par sa RAS dans le bain d'incubation.

EFFETS DE LA THIAMINE ET DE L'OXYTHIAMINE SUR L'ACTIVITE DE L'ACHÉ.

Pour le dosage de l'ACHé, la méthode de Dunant et Hirt (1976) est employée. L'activité enzymatique de l'ACHé de l'organe électrique, présente dans un extrait Lubrol W (ICI Pharma) du tissu (Zubler-Faivre et Dunant, 1976), est testée en présence des différentes concentrations de thiamine et d'oxythiamine, employées dans cette série d'expériences.

RESULTATS

A. EFFETS DE LA THIAMINE ET ANTIMETABOLITES SUR LA REPONSE ELECTROPHYSIOLOGIQUE.

Les résultats types présentés ici, proviennent d'une seule Torpille, mais sont représentatifs d'un grand nombre d'expériences effectuées sur plusieurs Torpilles.

EFFETS DE LA THIAMINE.

La figure V.1.2 montre les effets de différentes concentrations de Thia exogène (10^{-3} M ; 5×10^{-3} M et 10^{-2} M) sur la réponse électrophysiologique, au cours du temps de superfusion. L'allure des potentiels post-synaptiques engendrés par les électroplaques, après une heure de contact avec la thiamine (5×10^{-3} M et 10^{-2} M) est également dessinée.

La courbe témoin montre que dans les conditions physiologiques normales, le tissu produit pendant plusieurs heures, des réponses constantes à un seul stimulus. La thiamine à 10^{-3} M tend à induire une légère augmentation de la décharge électrique, ce, après 15 minutes de superfusion. Cette augmentation ne devient pas significativement plus importante au cours du temps. Avec cette concentration de vitamine, les différences par rapport au témoin se trouvent à la limite de la signification. Nous pouvons donc dire qu'à 10^{-3} M, la thiamine ne produit qu'un faible effet sur la réponse électrophysiologique. Avec la thiamine 5×10^{-3} M, une augmentation nette de l'amplitude de la décharge électrique est déjà visible après 15 minutes. Cet effet s'accroît encore, en moyenne pendant la première heure de superfusion ; au cours de la seconde heure, il tend à s'atténuer, pour finalement diminuer après 2 heures. Au cours du temps, la forme du potentiel n'est pratiquement pas modifiée. A 10^{-2} M, la thiamine produit d'abord également une augmentation importante de l'amplitude de la décharge, mais cet effet s'atténue déjà après 15 à 30 minutes de superfusion. Après environ une heure, l'amplitude

FIG. V. 1. 2.

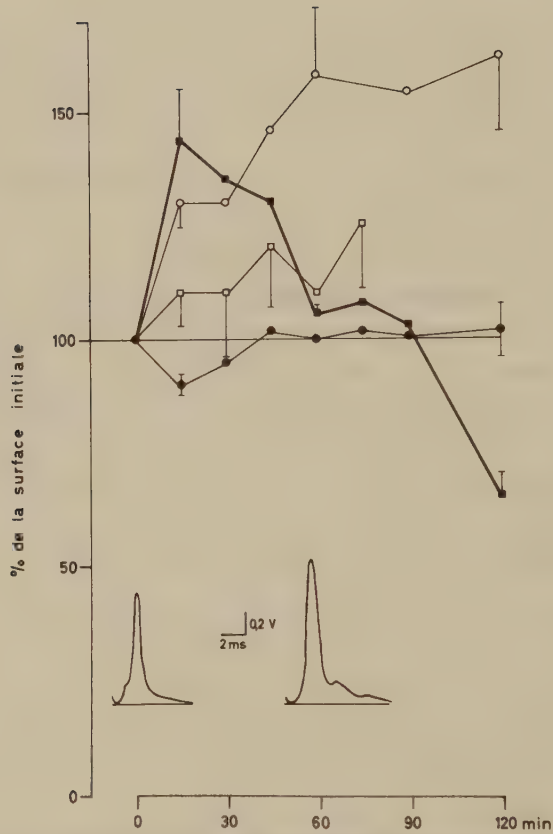


Figure V.1.2 : Effets de la thiamine exogène sur la réponse électrophysiologique, exprimés en fonction du temps. La réponse à un stimulus unique est tracée pour le temps initial $t = 0$ et pour $t = 60$ min de superfusion avec une solution de thiamine à 5×10^{-3} M. Des fragments tissulaires sont superfusés constamment avec le tampon physiologique additionné de thiamine 10^{-3} M (□-□), de Thiamine 5×10^{-3} M (○-○) et de thiamine 10^{-2} M (●-●). En cours de superfusion, la réponse à un stimulus unique supramaximal est photographiée sur l'écran de l'oscilloscope ; la surface de la décharge est exprimée en % de sa valeur initiale. Dans cette expérience type, chaque point correspond à la moyenne de 5 échantillons ; les écarts réduits ne sont indiqués que pour certains points cruciaux.

de la décharge décroît beaucoup pour atteindre un niveau significativement inférieur à celui du témoin. Donc, il semble qu'il existe une concentration donnée de thiamine, relativement élevée, qui dans le tissu est capable d'induire une augmentation de la décharge ; à partir de cette concentration limite, un excès de thiamine extracellulaire, entraîne assez rapidement une diminution importante de la décharge. Il faut remarquer que cet effet de la thiamine est réversible, même après 2 heures de superfusion avec la thiamine 10^{-2} M.

EFFETS DE L'OXYTHIAMINE ET DE LA PYRITHIAMINE.

Ajoutée au milieu de superfusion, l'oxythiamine produit des modifications considérables de la réponse électrophysiologique à un seul stimulus (Figure V.1.3). En effet, à la fois l'amplitude et la durée du potentiel sont augmentées. Environ pendant les 15 premières minutes de superfusion, seule l'amplitude commence à croître ; peu après l'allongement de la décharge, qui apparaît comme un épaulement sur la portion descendante de la courbe du potentiel, commence à se manifester. Au cours du temps, ces deux effets s'accroissent, davantage en ce qui concerne l'allongement de la durée que l'accroissement de l'amplitude. Cette double action de l'oxythiamine suggère deux cinétiques dans la formation de la décharge. Les différentes concentrations d'oxythiamine utilisées, montrent, qu'en cours de superfusion, l'oxythiamine 10^{-6} M, n'a aucun effet détectable sur la réponse ; par contre, un effet très important se manifeste déjà dans les premières 5 minutes, en présence

FIG. V.1. 3.

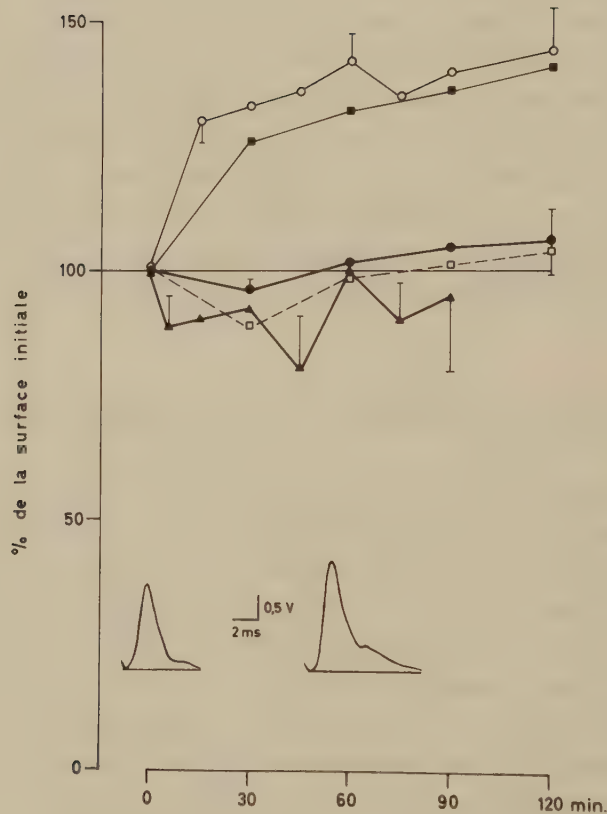


Figure V.1.3 : Effets de l'oxythiamine et de la pyriethiamine sur la réponse électrophysiologique, exprimés en fonction du temps. Cette expérience est du même type que celle de la figure V.1.2. La réponse à un stimulus unique supramaximal est reproduite pour $t = 0$ min et $t = 60$ min de superfusion avec de l'oxythiamine 10^{-4} M. Les effets des antimétabolites sont analysés en estimant la variation de la surface de la décharge (% de la surface initiale). Oxythiamine : 10^{-6} M (□—□) ; 10^{-5} M (■—■) ; pour ces 2 concentrations, $n = 2$ en chaque point ; 10^{-4} M (○—○), $n = 5$. Pyriethiamine : 10^{-4} M (▲—▲), $n = 3$. Témoins (●—●), $n = 5$. Les écarts réduits ne sont indiqués que pour certains points.

d'oxythiamine 10^{-5} M. A 10^{-4} M, l'effet de l'oxythiamine s'accroît légèrement, mais ne diffère pas significativement de celui à 10^{-5} M. Des tests avec l'oxythiamine à 10^{-3} M, présentent des effets analogues à ceux décrits ici, non proportionnels à la concentration. Quelle que soit la concentration de l'antimétabolite, les effets observés sont tous réversibles.

* La pyrithiamine n'a été testée qu'à la concentration de 10^{-4} M ; apparemment, elle n'induit aucune modification de la décharge électrique, et ce, pendant 90 minutes de superfusion constante.

En résumé, la thiamine et l'oxythiamine, mais pas la pyrithiamine, agissent réversiblement sur la transmission synaptique. Les effets de l'oxythiamine se manifestent à des concentrations beaucoup plus faibles que ceux de la thiamine. Ces deux substances entraînent des modifications différentes : la thiamine induit une augmentation transitoire seulement, de l'amplitude de la décharge, alors que l'oxythiamine, quelle que soit sa concentration, produit un accroissement durable à la fois de l'amplitude et de la durée. La thiamine (à faible concentration) et l'oxythiamine pourraient agir également sur un même processus enzymatique, qui serait responsable de la libération du transmetteur. Les constantes d'affinité de l'oxythiamine vis-à-vis d'un tel système enzymatique seraient toutefois plus basses que celles de la thiamine, ce qui expliquerait l'allongement de la durée de la décharge électrique produite par cet antimétabolite.

B. LIBERATION DE L'ACH ; EFFETS DE LA THIAMINE ET DE L'OXYTHIAMINE

La figure V.1.4, montre les résultats obtenus lorsque la libération du transmetteur est analysée par la méthode radiochimique décrite. Cette technique tire avantage de la propriété qu'a l'organe électrique d'utiliser aussi efficacement l'acétate que la choline, pour la synthèse de l'ACh. Dans l'expérience type décrite ici (1 Torpille), la ^3H -Choline et le ^{14}C -Acétate sont fournis au tissu. La libération d'ACh doublement marquée est analysée avant, pendant et après une stimulation répétitive à 10 Hz en superfusant avec le tampon physiologique normal. Le transmetteur libéré est immédiatement hydrolysé par l'AChE en ^3H -Choline et ^{14}C -Acétate, dont les radioactivités sont comptées dans le superfusat. Il faut noter qu'après les périodes relativement longues d'incubation et de lavage (24 heures), le taux d'ACh totale du tissu (nmoles/g) reste généralement très stable. De plus, le ^3H et le ^{14}C sont incorporés dans l'ACh dans un rapport proche de 1, donc sont utilisés avec une même efficacité.

Au repos, pendant la minute qui précède la stimulation, la libération de l'acétate (pmoles/min/g) est toujours significativement supérieure à celle de la choline. Ceci s'est vérifié sur un grand nombre d'expériences et se confirme si l'on inverse les 2 isotopes (^{14}C -Choline et ^3H -Acétate). Au moment de la stimulation, les 2 radioactivités libérées dans le superfusat augmentent très fortement et rapidement ; elles témoignent d'une libération d'ACh par le fait que le rapport $^{14}\text{C} / ^3\text{H}$ n'est pas significativement différent de 1. Dans la minute qui suit l'arrêt de la stimulation, les radioactivités libérées diminuent dans le superfusat, beaucoup plus lentement qu'elles ont crû, dès le début de la stimulation.

FIG. V.1.4.

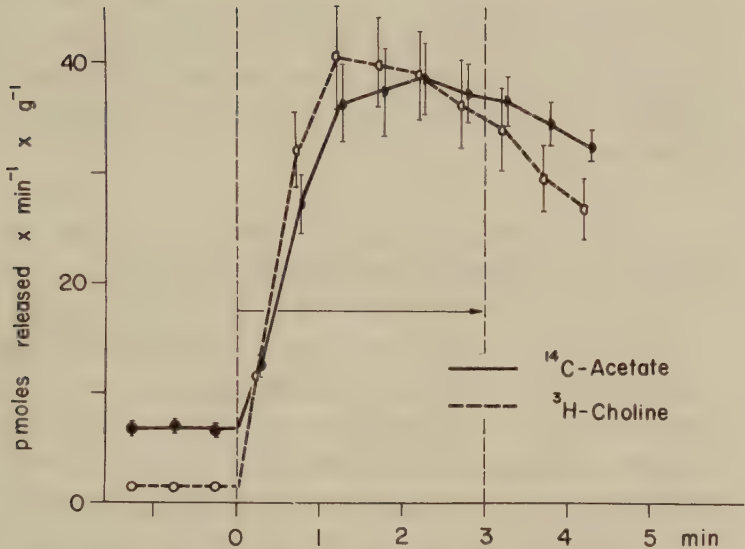


Figure V.1.4 : Libération d'ACh radioactive avant, pendant et après une stimulation répétitive du tissu. Dans cette expérience type, les fragments tissulaires sont incubés 4 heures dans le tampon physiologique Torpille, en présence de ¹⁴C-Acétate (●—●, 132 dpm/pmole) et de ³H-Choline (○-○, 1'320 dpm/pmole), aux mêmes concentrations (8,4 μm). Ces 2 précurseurs sont incorporés dans l'ACh. Après lavage du milieu extracellulaire, les échantillons sont stimulés répétitivement à 10 Hz, pendant 3 minutes, en les superfusant continuellement à 1 ml/min. Le superfusat est collecté au cours du temps et le ¹⁴C et le ³H y sont comptés, permettant une mesure directe et sensible de l'ACh libérée. Chaque point expérimental est la moyenne $\pm$ écart réduit de 5 échantillons.

Ce retard est dû à la diffusion de la radioactivité à partir des zones plus centrales des prismes. De plus, nous pouvons constater que, durant cette minute de récupération, la libération de choline tend à redevenir inférieure à celle de l'acétate.

EFFETS DE LA THIAMINE ET DE L'OXYTHIAMINE.

Au repos, quelle que soit la concentration utilisée, la thiamine aussi bien que l'oxythiamine, après 1 heure de superfusion, ne changent pas la quantité de radioactivité libérée, comparativement aux témoins. De plus, la libération spontanée d'ACh radioactive a été suivie pendant 2 h 30 en superfusant des échantillons radioactifs, soit avec de la thiamine (5×10^{-3} M), soit avec de l'oxythiamine (10^{-4} M) ; aucune de ces substances n'a induit une augmentation de la libération au repos.

Thiamine :

Nous avons d'abord examiné les effets de la thiamine 10^{-3} M, après 15 et 60 minutes de superfusion. A cette concentration, nous observons toujours une légère augmentation de la libération induite d'ACh, et ce, pour chaque temps, en cours de stimulation. Cependant, les valeurs obtenues présentent généralement une assez forte dispersion ; de ce fait, il est difficile de mettre en évidence une différence significative d'avec les témoins. Toutefois, si nous considérons la quantité moyenne d'ACh radioactive libérée en cours de stimulation (3 min), nous remarquons que la

thiamine 10^{-3} M libère une quantité de radioactivité (^3H - ^{14}C) significativement supérieure à celle du témoin ($2\% < p < 5\%$).

La figure V.1.5 (b et c) montre les effets de la thiamine exogène à 5×10^{-3} M. Seules les valeurs de ^{14}C sont indiquées ; le rapport $^{14}\text{C} / ^3\text{H}$ n'est pas modifié dans ces conditions, par rapport aux témoins. Lors de la stimulation électrique, la libération d'ACh est fortement réduite par cette concentration de thiamine, et ce, dès le début de la stimulation. De plus, cet effet se manifeste déjà avec la même importance, après des durées très brèves de superfusion (Figure V.1.4.c). En effet, après une minute de superfusion, la libération induite d'ACh est déjà très significativement inférieure à celle des témoins. Après 4 minutes de superfusion, nous ne pouvons distinguer aucune différence significative d'avec 1 minute. Après 1 minute ou 1 heure de contact avec la thiamine, la libération d'ACh a diminué de 50 %, comparativement aux témoins respectifs.

Dans une expérience, nous avons également testé les effets de la TPP exogène, à 10^{-3} M ; aucune modification ne s'est produite. Ceci s'explique probablement par l'imperméabilité des membranes vis-à-vis de cet ester phosphorique (Fox et Duppel, 1975).

Oxythiamine :

Les résultats de l'expérience type, avec l'oxythiamine (10^{-4} M) proviennent de fragments tissulaires marqués en ^{14}C -Choline et ^3H -Acétate. Seuls les résultats en ^{14}C sont représentés (Figure V.1.5.a). Les échantillons sont stimulés après 60 minutes de superfusion avec l'oxythiamine. Dès le début de la stimulation, la quantité d'ACh libérée est

FIG. V. 1. 5.

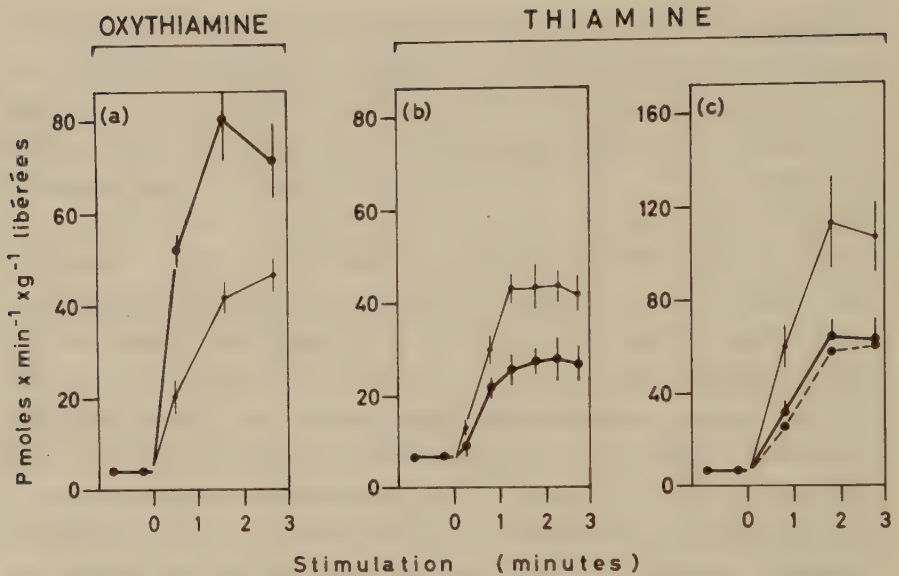


Figure V.1.5 : Effets de l'oxythiamine et de la thiamine exogènes sur la libération d'ACh radioactive. Le procédé expérimental est celui décrit dans la figure V.1.4. La radioactivité libérée est déterminée pendant la minute qui précède la stimulation et pendant les 3 minutes de stimulation. Dans tous les graphiques, les lignes fines correspondent aux témoins. (a) Effets de l'oxythiamine à 10^{-4} M. Les fragments sont marqués avec de la ^{14}C -Choline et du ^3H -Acétate ; seules les valeurs de ^{14}C sont indiquées ; $n = 4$, pour chaque point. (b) Effets de la thiamine à 5×10^{-3} M, après 1 heure de superfusion ; $n = 4$. (c) Effets de la thiamine à 5×10^{-3} M, après 1 min (●—●) et 4 min (●---●) de superfusion. Ces résultats proviennent d'une Torpille mâle ; pour chaque point, $n = 3$; les écarts réduits ne sont pas indiqués pour les valeurs après 4 min, celles-ci ne diffèrent pas significativement de celles après 1 min. Pour (b) et (c), les valeurs correspondent à du ^{14}C -Acétate.

fortement accrue par rapport aux témoins. Le taux maximal de libération se situe à 1,5 minutes et la quantité de transmetteur libéré paraît environ 2 fois supérieure à celle des témoins.

EFFETS DE LA THIAMINE ET DE L'OXYTHIAMINE SUR L'ACTIVITE DE L'ACHÉ.

L'activité enzymatique de l'ACHé extraite de l'organe électrique est déterminée en présence de thiamine 10^{-3} , 5×10^{-3} et 10^{-2} M, ainsi que d'oxythiamine 10^{-4} M. Lorsque la concentration du substrat (perchlorate d'ACh) est de 10^{-2} M, nous retrouvons les % suivants de l'activité enzymatique normale : 91 % avec la thiamine 10^{-3} M, 87 % avec 5×10^{-3} et 55 % avec 10^{-2} M. Donc, pour des concentrations inférieures au substrat, la thiamine n'inhibe pas de façon importante l'ACHé. A 10^{-2} M, l'inhibition est d'allure compétitive et pourrait être attribuée, d'une part à la formation d'un complexe Thia-ACh, dont la stabilité augmente au fur et à mesure que la concentration de vitamine est accrue (Galzigna, 1969) ; d'autre part, en raison de son ammonium quaternaire, la thiamine pourrait se lier au site actif de l'enzyme. A cet égard, la choline à 10^{-3} M inhibe à 40 % l'activité enzymatique, et la choline à 10^{-2} M, à 90 % (Dunant et Hirt, 1976).

L'oxythiamine, elle, ne produit aucune inhibition de l'ACHé. L'allongement de la réponse n'est donc pas dû à un effet semblable à celui de l'ésérine.

DISCUSSION

L'oxythiamine, antimétabolite de la thiamine, agit à relativement faible concentration au niveau des mécanismes de la transmission synaptique. L'augmentation considérable qu'elle induit, tant dans l'amplitude que dans la durée de la décharge électrique, provient indubitablement d'un effet sur la libération du transmetteur. Toute explication faisant appel à une inhibition de l'AChE est à exclure. Après avoir pénétré dans les cellules, l'oxythiamine est phosphorylée ; c'est probablement sous cette forme qu'elle intervient comme inhibiteur des systèmes enzymatiques à TPP (Cerecedo et coll., 1951).

Par contre, la pyrithiamine, également antimétabolite de la thiamine, n'exerce aucun effet à la même concentration que l'oxythiamine. Nous avons vu, qu'au contraire, seule la pyrithiamine semble affecter l'excitabilité et la conduction axonales. Toutefois, en ce qui concerne la transmission synaptique, l'oxythiamine aussi bien que la pyrithiamine, semblent réduire le potentiel postganglionnaire dans le ganglion cervical supérieur, où Perri et coll. (1970) suggèrent qu'elles pourraient altérer la synthèse du transmetteur.

Les effets de la thiamine sont plus complexes. Ils semblent être fonction de la concentration. A 10^{-3} M, bien que les changements soient peu accentués, la libération d'ACh augmente légèrement, mais significativement. Les effets à 5×10^{-3} M sont, à première vue, contradictoires :

l'amplitude de la décharge électrique est fortement accrue alors que la quantité de médiateur libéré est fortement réduite. Cette apparente contradiction s'expliquerait par des temps de diffusion longs à travers les 4 à 5 mm d'épaisseur des fragments tissulaires ; dans ce sens, les régions centrales du tissu, principalement responsables de la génération de la décharge électrique, se trouvent, pendant des temps relativement longs, exposées à des concentrations de thiamine plus faibles que les zones superficielles. Or, c'est précisément à partir de la surface que l'ACh libérée est collectée. En conclusion, la thiamine pourrait exercer un double effet, en fonction de sa concentration dans le tissu : aux faibles concentrations, elle agirait spécifiquement en augmentant la quantité de transmetteur libéré et par conséquent, l'amplitude de la décharge s'accroît ; à plus forte concentration (supérieure à 10^{-3} M), elle réduit la libération, peut-être par un mécanisme peu spécifique au niveau des membranes présynaptiques ; par exemple, elle pourrait gêner l'entrée présynaptique de Ca^{2+} , nécessaire à une libération efficace de transmetteur. Koda et coll. (1970) décrivent des effets analogues à ceux observés ici : lors de la stimulation indirecte d'une préparation nerf-diaphragme de rat, la thiamine, à 5×10^{-3} M, exerce un effet curarisant, alors qu'à 10^{-3} M, elle potentialise les contractions.

Les résultats obtenus pourraient indiquer que la thiamine intervient de manière assez directe, dans la libération du transmetteur. Son site d'action se localiserait dans les terminaisons nerveuses, peut-être au niveau d'un système enzymatique membranaire, responsable de la libération.

L'oxythiamine, agissant comme analogue, pourrait intervenir au même niveau, mais avec des paramètres cinétiques différents ce qui expliquerait l'allongement dans la durée de la décharge électrique.

V.2 EFFETS DE LA THIAMINE EXOGENE SUR L'INCORPORATION DE LA CHOLINE ET DE L'ACETATE DANS L'ACH

Ainsi que nous l'avons démontré, la thiamine exogène modifie la quantité de transmetteur libéré par stimulation électrique. La choline et l'acétate, présents dans la fente synaptique, sont alors recaptés par les terminaisons nerveuses, qui les utilisent préférentiellement pour la resynthèse de l'ACh. Ce turnover rapide concerne surtout le compartiment libre du transmetteur (Dunant et coll., 1971 ; 1972).

Quels sont les effets de la thiamine exogène sur l'incorporation de ces deux précurseurs dans la molécule d'ACh ?

Principe.

Les deux précurseurs radioactifs de l'ACh sont fournis en concentrations équivalentes au tissu. La thiamine est ajoutée au milieu d'incubation, à deux concentrations différentes, une en défaut, l'autre en excès par rapport à chaque précurseur. Après incubation et lavage, les effets de la thiamine sont estimés sur la radioactivité totale incorporée, ainsi que sur les taux d'ACh radioactive formée.

MATERIEL ET METHODES

PROCEDE.

Les fragments tissulaires sont incubés 2 heures, en présence de (méthyl¹⁴C)-Acétate (0,5 μ Ci/ml) et de

(2-méthyl³H)-Choline (2 µCi/ml), tous deux à la concentration de 5×10^{-5} M. Les effets de la thiamine sont testés à 10^{-5} M et à 10^{-4} M (concentrations finales dans le bain d'incubation). Après lavage des précurseurs radioactifs (4 fois 30 min, dans 100 ml de tampon physiologique), les échantillons sont extraits au TCA 5 % ; un aliquot de 20 µl est compté pour chaque extrait et permet de déterminer les ¹⁴C et ³H totaux retenus par le tissu. Après lavage à l'éther, environ 25 à 30 % de la radioactivité totale des extraits sont perdues pour le ¹⁴C aussi bien que pour le ³H ; 10 µl de chaque extrait, additionné de standards internes ACh + choline non radioactifs, sont soumis à une électrophorèse à haute tension, dans les conditions employées pour séparer la thiamine et ses esters-P ; dans ce cas, la ligne de départ est tracée à 3 cm du côté anodique de la feuille. Les migrations de l'ACh et de la choline sont révélées par des vapeurs d'iode ; après décoloration, ces spots sont découpés et élués dans 2 ml d'H₂O b.d. ; après 1 heure, la radioactivité est comptée dans 10 ml d'Instagel. Les valeurs trouvées pour l'ACh sont converties en nmoles/g de chaque précurseur incorporé. Dans ces conditions d'électrophorèse, nous obtenons une séparation satisfaisante de la choline, l'ACh, la thiamine et la TMP, migrant toutes vers la cathode.

RESULTATS

Les résultats obtenus proviennent d'une seule Torpille. Pour chaque point expérimental, 3 fragments tissulaires sont analysés.

INCORPORATION DE LA RADIOACTIVITE TOTALE (nmoles/g ^{14}C et ^3H).

Le tableau V.2.1 indique les quantités de radioactivité totale en ^3H -Choline et ^{14}C -Acétate, retenues par le tissu après lavage du milieu extracellulaire. D'une manière générale, nous constatons que le ^{14}C -Acétate est significativement supérieur à la ^3H -Choline totale. L'adjonction de thiamine à 10^{-5} M entraîne une diminution significative de la choline totale retenue ; cet effet n'est pas accentué à 10^{-4} M de thiamine. La vitamine semble donc réduire fortement l'entrée de choline, qu'elle soit en excès ou en défaut par rapport à ce précurseur. Par contre, l'incorporation d'acétate total n'est aucunement modifiée par la présence de thiamine.

INCORPORATION DE LA ^3H -CHOLINE ET DU ^{14}C -ACETATE DANS L'ACH (Figure V.2.1).

Dans les témoins, (0 thiamine), le ^3H et le ^{14}C s'incorporent à des taux très proches dans la molécule d'ACH. Des radioactivités totales respectives, retenues par le tissu, environ le 26 % de choline et le 19 % d'acétate passent dans l'ACH. L'adjonction de thiamine 10^{-5} M réduit considérablement et significativement les taux de chaque précurseur dans l'ACH. Dans cette condition, les taux de ^3H et ^{14}C , présents dans le spot du transmetteur, se trouvent exactement dans un rapport 1 : 1. La ^3H -ACH représente le 19 % du ^3H total ; de même, la ^{14}C -ACH constitue le 16 % du ^{14}C total. Ces deux valeurs sont significativement différentes de celles correspondantes, trouvées pour les témoins. A 10^{-4} M, la thiamine constitue

TABLEAU V.2.1

ADJONCTION	RADIOACTIVITE TOTALE INCORPOREE NMOLES/G	
	(2- ³ H-METHYL)-CHOLINE	(¹⁴ C-METHYL)-ACETATE
0	80,3 ± 0,8	91,5 ± 3,1
THIA 10 ⁻⁵ M	64,8 ± 3,6	80,6 ± 9,1
THIA 10 ⁻⁴ M	66,2 ± 0,9	95,4 ± 4,9

Radioactivités totales incorporées par des fragments tissulaires incubés en absence et en présence de Thiamine. La ³H-Choline (2 µCi/ml) et le ¹⁴C-Acétate (0,5 µCi/ml) sont fournis simultanément au tissu, dans des concentrations équivalentes (5 x 10⁻⁵ M). Après 2 heures d'incubation et 2 heures de lavage, les échantillons sont extraits au TCA. 20 µl de chaque extrait sont comptés avant le lavage à l'éther, et la radioactivité totale retenue par le tissu est calculée pour chaque précurseur, en nmoles/g. Ces valeurs sont des moyennes ± écart réduit, de 3 échantillons.

FIG. V. 2. 1.

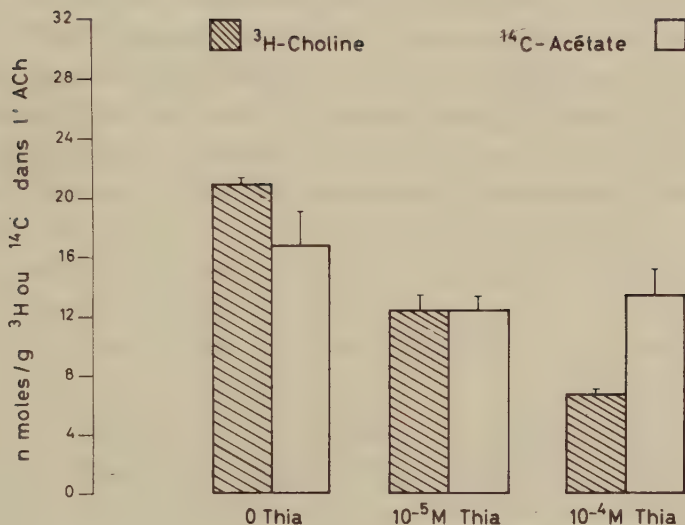


Figure V.2.1 : Incorporation de ^3H -Choline et de ^{14}C -Acétate dans l'ACh : effets de la thiamine exogène. Les fragments tissulaires sont incubés 2 heures, en présence de (2-méthyl ^3H)-Choline ($2\text{ }\mu\text{Ci/ml}$), et de (2-méthyl ^{14}C)-Acétate ($0,5\text{ }\mu\text{Ci/ml}$), à la concentration de $5 \times 10^{-5}\text{ M}$ chacun. Les effets de la thiamine sont testés à 10^{-5} M et à 10^{-4} M . Après lavage des précurseurs, les fragments sont extraits au TCA, puis soumis à une électrophorèse à haute tension. Les valeurs sont exprimées en nmoles/g (+ écart réduit) de chaque isotope incorporé dans l'ACh ; pour chaque concentration de thiamine testée, $n = 3$.

une concentration 2 fois supérieure à celle de chaque précurseur radioactif ; dans cette condition, le taux de ^3H -Choline dans l'ACh a encore diminué significativement et représente le 10 % du ^3H total retenu par le tissu. Par contre, cette augmentation de la concentration de thiamine ne modifie plus le taux d'incorporation de l'acétate dans l'ACh ; de ce fait, il en résulte une ACh plus fortement marquée en ^{14}C qu'en ^3H . La ^{14}C -ACh représente, dans ce cas, le 14 % du ^{14}C total retenu. Il semble qu'à cette concentration de thiamine exogène, il se produise un "découplage" dans l'utilisation de l'acétate et de la choline pour la synthèse de l'ACh.

DISCUSSION

Ces résultats montrent que, d'une manière générale, la thiamine exogène tend à diminuer les taux d'incorporation des deux précurseurs dans la molécule d'ACh. Il est toutefois difficile de dire si la vitamine agit au niveau des systèmes de transport transmembranaire ou/et au niveau de la choline acétyltransférase (CAT), responsable de la synthèse du transmetteur. En présence de thiamine, la choline totale retenue dans le tissu diminue ; de ce total, des proportions de plus en plus faibles de précurseur sont incorporées dans l'ACh, si l'on augmente les concentrations de vitamine. La choline emprunte deux systèmes de transport, un à basse affinité et un à haute affinité ; plusieurs auteurs ont démontré que dans les terminaisons nerveuses cholinergiques, la synthèse de l'ACh par la CAT, nécessitait la présence du système à haute affinité (Yakamura et Snyder, 1973 ;

Lefresne, 1974). Il se pourrait que la thiamine, peut-être par la présence de son ammonium quaternaire, intervienne en diminuant ce transport à haute affinité et par là, diminuerait le taux de synthèse de l'ACh. De ce fait, la choline serait plutôt transportée par le système à basse affinité, vers d'autres constituants cellulaires. La thiamine ne modifie pas la quantité d'acétate total retenu par le tissu, par contre elle diminue significativement son incorporation dans l'ACh. Une analyse de la radioactivité sur toute la longueur de l'électrophorégramme a révélé la présence d'autres métabolites du tissu, ayant incorporé le ^{14}C -Acétate mais pas la ^3H -Choline. Ces substances n'ont pas encore été identifiées et nous ne pouvons dire dans quelle mesure la thiamine modifie le taux d'acétate qu'elles renferment. Dans l'organe électrique, l'incorporation d'acétate dans l'ACh augmente en fonction de la concentration de la choline présente simultanément dans le bain d'incubation (Morel, 1976) ; des effets analogues sont également constatés dans des cultures de neuroblastomes cholinergiques (Kato et coll., 1977). L'effet de la thiamine sur l'incorporation de l'acétate dans l'ACh pourrait être secondaire à celui que la vitamine produit sur l'incorporation de choline.

Une autre explication possible de ces effets de la thiamine serait la transformation de l'ACh libre, dont l'utilisation et le renouvellement sont rapides, en une forme liée, dont le turnover est plus lent.

VI

RESUME ET CONCLUSIONS

VI.1 RESUME

Identification de la thiamine dans l'organe électrique :

1. La teneur en thiamine totale mesurée dans l'organe électrique s'avère étonnamment élevée, comparativement à d'autres tissus (120 nmoles/g de tissu frais). Dans ce total, la thiamine et ses esters-P se distribuent ainsi : 32 % de Thia, 22 % de TMP, 8 % de TPP (cocarboxylase) et 38 % de TTP. Dans le cerveau de mammifères, cette répartition est différente, la TPP représente le 80 % de la thiamine totale. Les valeurs obtenues, à notre avis, ne peuvent s'expliquer par un rôle unique de cofacteur, à plus forte raison dans ce tissu pauvre en mitochondries, et dont le métabolisme oxydatif est lent.
2. L'examen du tissu par histofluorescence révèle une présence massive de thiamine dans les éléments nerveux (fibres nerveuses myélinisées et non myélinisées, terminaisons nerveuses). L'électroplaque elle-même ne contient que peu ou pas de thiamine. Cette localisation présuppose un rôle important de la vitamine dans le tissu nerveux.
3. Les préparations purifiées de synaptosomes renferment de fortes concentrations d'ACh et de thiamine, principalement sous forme de TTP ; les activités spécifiques du médiateur et de la TTP y sont très proches, suggérant une fonction spécifique de cet ester dans le métabolisme de la terminaison nerveuse.

Variations comparées d'ACh, des thiamines et d'ATP, dans différentes conditions expérimentales :

Les variations de l'ATP, dans certaines conditions expérimentales, ont été déterminées par Israël et coll. (1977).

4. Les effets de la stimulation électrique sont analysés sur la 3e période de l'oscillation rapide de l'ACh ; une variation périodique significative du taux d'esters-P se dessine, apparemment en phase avec l'oscillation rapide du transmetteur. Une relation dynamique ACh-ATP-esters-P est suggérée, l'ATP oscillant en phase avec le transmetteur.
5. L'homogénéisation du tissu en milieu salin isoosmotique, induit une phosphorylation nette de la thiamine, surtout en faveur de la TTP. Dans cette condition, le 40 à 50 % du transmetteur, correspondant à l'ACh "libre", est hydrolysé par l'ACHÉ tissulaire. L'ATP subit également une hydrolyse. De plus, la TTP varie inversement avec les quantités d'ACh tissulaire mesurées. La relation ACh-ATP-TTP se préciserait.
6. Le rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ est modifié de manière extrême dans le milieu extérieur. Au fur et à mesure que le Ca^{2+} diminue au profit du Mg^{2+} , le taux de phosphorylation de la thiamine augmente. En absence de calcium, les taux d'ATP baissent. Le Ca^{2+} et le Mg^{2+} semblent intervenir dans la régulation des équilibres Thia / esters-P ainsi que ACh liée / ACh libre. La relation métabolique directe ACh-ATP-esters-P se confirmerait.

Incorporation de thiamine exogène :

7. La thiamine radioactive, fournie au tissu, est activement métabolisée en esters-P. Un K_m apparent, résultant à la fois du transport membranaire de la vitamine et de son estérification, est estimé à 5×10^{-4} M. La choline exogène augmente la quantité de thiamine totale retenue par le tissu ; l'acétate exogène accroît son taux de phosphorylation. La thiamine pourrait intervenir dans le transport transmembranaire de l'acétate.

Effets de la thiamine exogène sur le métabolisme de l'ACH :

8. Au cours du temps, la thiamine crée une augmentation, suivie plus tard, d'une diminution de l'amplitude de la décharge électrique ; ces effets, fonction du temps et de la concentration de la vitamine, sont très probablement dus à des modifications dans la quantité de transmetteur libéré. L'oxythiamine, antimétabolite de la thiamine, agit à plus faible concentration que la vitamine B_1 , en augmentant l'amplitude et la durée de la décharge, et ce, d'une manière durable. Ces effets correspondent à une forte augmentation de la libération d'ACH. L'oxythiamine et, à faible concentration, la thiamine, pourraient agir sur un même mécanisme enzymatique, responsable de la libération ; des constantes d'affinité plus basses pour l'oxythiamine, expliqueraient l'allongement de la décharge qu'elle induit. Tous les effets de la thiamine et de l'oxythiamine sont réversibles. La pyrithiamine, autre antimétabolite de la thiamine, n'a produit aucun effet.
9. La thiamine exogène diminue significativement les taux de choline et d'acétate radioactifs incorporés dans l'ACH.

Cet effet pourrait s'expliquer, soit par une certaine inhibition du transport à haute affinité pour la choline, soit par une transformation de l'ACh libre en forme liée, dont le turnover est plus lent.

10. Il est conclu que la thiamine est intimement liée au métabolisme de l'ACh. Les mécanismes possibles ainsi que les lieux d'action de la vitamine sont discutés.

VI.2 CONCLUSIONS

Indubitablement, ces résultats témoignent d'une intervention de la thiamine dans le fonctionnement de la synapse cholinergique, plus précisément dans le métabolisme de l'ACh. Le mécanisme réel reste toutefois difficile à cerner avec précision. En effet, non seulement la thiamine modifie la libération du médiateur, mais encore, elle paraît liée à sa synthèse ainsi qu'à sa distribution entre les compartiments lié et libre. Il est évident qu'une diminution de la synthèse de l'ACh disponible, ou la transformation de cette dernière en sa forme liée, entraîneront une réduction de la quantité libérée. La thiamine existe sous 4 formes, Thia, TMP, TPP et TTP ; parmi celles-ci, la TPP ou cocarboxylase, est bien connue comme cofacteur, responsable du transfert de groupes acétyles ; en outre, la TTP est envisagée par plusieurs auteurs, comme la forme de thiamine nécessaire à l'excitabilité nerveuse. D'après nos résultats, nous pourrions suggérer que ces deux formes de thiamine sont également importantes pour le métabolisme du transmetteur, la TPP, en transportant l'acétate vers l'ACh, la TTP, en intervenant dans la libération. A cet égard, les faits suivants sont intéressants : a) la mise en évidence, par Lefresne et coll. (1978), d'une pyruvate déshydrogénase (PDH) extramitochondriale, localisée à la membrane des terminaisons nerveuses cholinergiques du cerveau de mammifères. Chez la Torpille, ce site enzymatique pourrait être responsable du transport de l'acétate, via la TPP ; b) Barchi et coll. (1976) ont caractérisé, dans le cerveau, une thiamine-triphosphatase (TTPase) associée aux membranes, et très spécifique

pour la TTP ; cet enzyme nécessite la présence d'un cation divalent (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) et son activité est modulée par le rapport ATP / ADP. Le vrai substrat serait le complexe Mg^{2+} -TTP. Une activité enzymatique semblable existe également dans les tissus où les transports actifs sont importants (rein et intestin). Dans l'organe électrique, nos résultats tendent à préciser un lien ACh-TTP ; il se pourrait donc qu'une TTPase membranaire participe à la libération d'ACh ; c) Une TTPase soluble a également été caractérisée par Hashitani et Cooper (1972) ; elle présente des propriétés très différentes de la TTPase membranaire, et notamment, elle est inactivée par des concentrations croissantes de Ca^{2+} ; d) Dans la fraction synaptosomale du cortex de rat, les ions calcium causent une phosphorylation importante de 2 protéines spécifiques ; ces résultats suggèrent que le Ca^{2+} déclenche la libération du médiateur, via cette phosphorylation (De Lorenzo, 1976) ; e) En solution, la molécule d'ACh existe sous deux configurations en équilibre : la forme nicotinique et la forme muscarinique. La molécule de thiamine est capable de former des complexes stables, dans un rapport 1 : 1, avec la molécule d'ACh sous sa forme nicotinique (Galzigna, 1969).

Ces faits étant connus, nous pourrions imaginer un mécanisme mettant en relation la thiamine et l'ACh dans la transmission synaptique. La figure VI.2.1 représente 4 états successifs, au niveau de la membrane présynaptique, à savoir, l'état de repos (état 1), et, après stimulation, l'état correspondant à la libération d'ACh (état 2), suivi des états où l'acétate, produit d'hydrolyse de l'ACh, est recapté

FIG. VI. 2. 1.

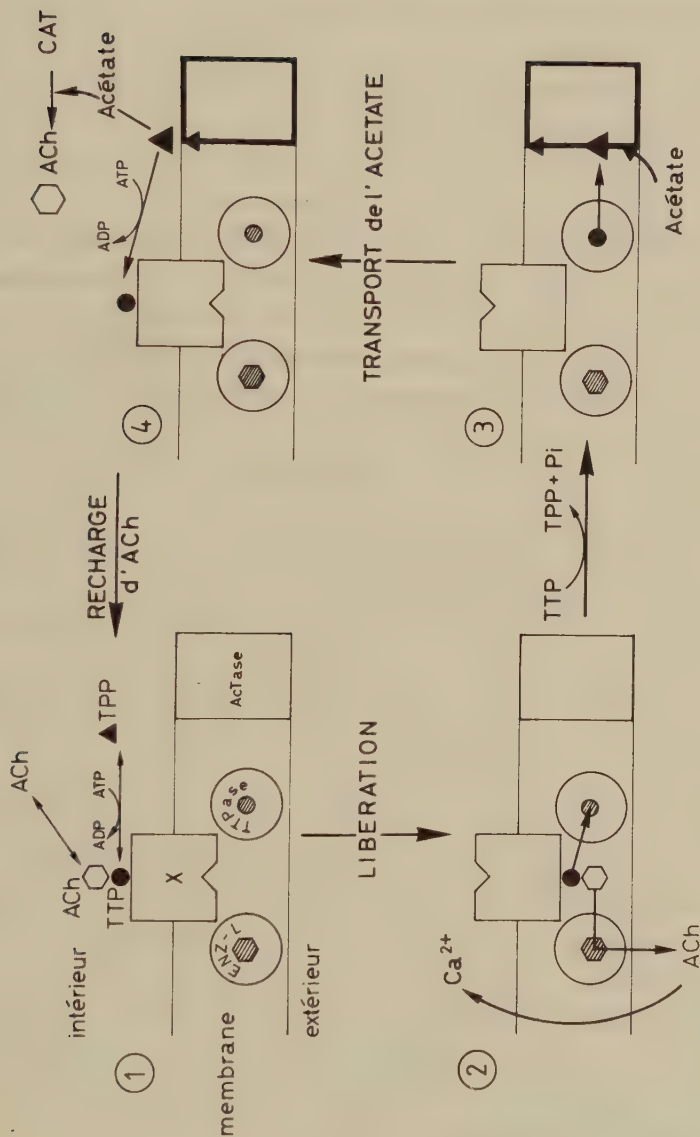


Figure VI.2.1 : Mécanisme hypothétique proposé pour l'implication de la thiamine dans le métabolisme de l'ACh. $\bigcirc$ ACh sous forme nicotinique ; ENZ-L : complexe enzymatique responsable de la libération de l'ACh ; $\bullet$ site actif de l'enzyme. TPPase : thiamine triphosphatase membranaire et $\bullet$ représente son site d'actif liant le complexe Mg^{2+} -TPP. AcTase : acétyltransférase, responsable du transport membranaire de l'acétate exogène, via la TPP. Les explications des états ①, ②, ③ et ④ sont données dans le texte.

et transporté dans le cytoplasme, pour être incorporé dans la molécule d'ACh nouvellement synthétisée (états 3 et 4).

Admettons que dans le tissu au repos (état 1), une certaine proportion de thiamine, sous forme de TTP, existe associée avec une protéine membranaire X, par l'intermédiaire d'un cation divalent (Ca^{2+} ou Mg^{2+}).

Sous cette forme liée, la vitamine B_1 échapperait à l'extraction et/ou au dosage ; ceci expliquerait les teneurs significativement inférieures de thiamine totale, trouvées dans le tissu entier au repos, comparativement aux homogénats ou au tissu stimulé. Pour revenir à notre hypothèse, la TTP fixée de la sorte, se complexerait à une quantité équivalente d'ACh libre, conférant au transmetteur ainsi lié, une forme nicotinique stable. L'ACh "libre" existerait donc dans le cytoplasme, sous forme complexée et non complexée.

Au moment de la stimulation nerveuse, l'entrée de Ca^{2+} à travers la membrane, déclencherait le passage de l'état 1 à l'état 2, c'est-à-dire la libération de l'ACh, de la manière suivante : d'une part, le Ca^{2+} activerait la synthèse de TTP à partir de la TPP et de l'ATP, augmentant ainsi le nombre de sites pouvant se charger en ACh nicotinique ; d'autre part, la protéine X, supportant le complexe TTP-ACh, serait phosphorylée, ce qui entraînerait son changement conformationnel ; de la sorte, le complexe TTP-ACh serait amené près des sites actifs de la TTPase membranaire ainsi que de l'enzyme responsable de la libération de l'ACh (Enz.-L.) ; cette dernière ne pourrait reconnaître comme substrat que l'ACh nicotinique. Simultanément, auraient alors lieu l'hydrolyse de la TTP en TPP + Pi, ainsi que la libération enzymatique de l'ACh.

Dans l'état 3, l'acétate provenant de l'hydrolyse enzymatique de l'ACh par l'AChE, serait recapté par une acétyltransférase membranaire (AcTase), utilisant la TPP comme transporteur. Dans l'état 4, cet acétate transporté à travers la membrane, serait incorporé dans la molécule d'ACh, nouvellement synthétisée par la CAT. Dans le cytoplasme, la TPP, libérée de l'acétate qu'elle a transporté, serait rephosphorylée en TTP ; le système pourrait alors se recharger en ACh nouvellement synthétisée (retour à l'état 1).

Galzigna (1969) a démontré que la thiamine pouvait former des complexes de transfert de charges, également avec d'autres neurotransmetteurs. L'intervention de la thiamine n'est peut-être pas exclusivement réservée aux synapses cholinergiques.

La séparation et la caractérisation des protéines composant la membrane présynaptique, isolée à partir de synaptosomes purifiés, devraient permettre de cerner davantage le problème de la transmission synaptique, et par là, de mieux comprendre l'interrelation Thiamine-ACh.

VII

BIBLIOGRAPHIE

- AGREN, G. (1946). On the action of a factor interfering with the chemical determination of thiamine by the method of Melnick and Field. II. Acta physiol. Scand. 11, 34-41.
- ARAKI, M. and CHIN, C. (1956). Histochemical study on thiamine. J. of Vitaminol. 2, 128-140.
- ARMETT, C.J. and COOPER, J.R. (1956). The role of thiamine in nervous tissue : effect of antimetabolites of the vitamin on conduction in mammalian non-myelinated nerve fibers. J. Pharm. Exper. Therap. 148, 137-143.
- BABEL-GUERIN, E. (1974). Métabolisme du calcium et libération de l'acétylcholine dans l'organe électrique de la Torpille. J. Neurochem. 23, 525-532.
- BABEL-GUERIN, E., BOYENVAL, J., DROZ, B., DUNANT, Y. and HASSIG, R. (1977). Accumulation of calcium in cholinergic axon terminals after nerve activity. Localization by electron microscope radio-autography at the nerve-electroplaque junction of Torpedo. Brain Res. 121, 348-352.
- BARCHI, L.R. (1976). Thiamine triphosphatase in the brain. In "Thiamine", ed. by Gubler, C.J., Fujiwara, M. and Dreyfus, P.M., p. 195-212.
- BARCHI, L.R. (1976). The non metabolic role of thiamine in excitable membrane function. In "Thiamine", ed. by Gubler, C.J., Fujiwara, M. and Dreyfus, P.M., p. 283-305.

- BENNET, M.V., WURTZEL, M. and GRUNDFEST, M. (1961). Properties of electroplaques of Torpedo nobiliana. J. gen. Physiol. 44, 757-804.
- BOISSIER, J.-R., TILLEMENT, J.-P. et MERLIN, L. (1966). Dosage fluorimétrique de fortes quantités de thiamine libre et combinée dans les tissus. Annal. pharm. françaises 24, 633-638.
- BURCH, H.B., BESSEY, O.A., LOVE, R.H. and LOWRY, O.H. (1952). The determination of thiamine and thiamine phosphates in small quantities of blood and blood cells. Biochem. J. 98, 477-490.
- CERECEDO, L.R., SODAK, M. and EUSEBI, A.J. (1951). Studies on thiamine analogues. J. Biol. Chem. 189, 293-299.
- COOPER, J.R., ITOKAWA, Y. and PINCUS, J.H. (1969). Thiamine triphosphate deficiency in subacute necrotizing encephalomyelopathy. Science 164, 72-73.
- COOPER, J.R. and PINCUS, J.H. (1973). In "Inborn errors of Metabolism" ed. by Hommes, F.A. and Van der Berg, C.J., Academic Press, N.Y. p. 119-132.
- COOPER, J.R., ROTH, R.H. and KINI, M.M. (1963). Biochemical and physiological function of thiamine in nervous tissue. Nature (London) 199, 609-610.
- DEL CASTILLO, J. and KATZ, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. J. Physiol., Lond., 124, 560-573.

- DEL CASTILLO, J. and ENGBAEK, L. (1954). The nature of neuromuscular block produced by magnesium. *J. Physiol., Lond.*, 124, 370-384.
- DE LORENZO, R.J. (1976). Calcium-dependent phosphorylation of specific synaptosomal fraction proteins : possible role of phosphoproteins in mediating neurotransmitter release. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 71, 590-597.
- DE ROBERTIS, E., DE IRALDI, A.P., RODRIGUEZ, G. and GOMEZ, J. (1961). On the isolation of nerve endings and synaptic vesicles. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 229-235.
- DUNANT, Y., GAUTRON, J., ISRAËL, M., LESBATS, B. et MANARANCHE, R. (1971). Effets de la stimulation de l'organe électrique de Torpille sur les compartiments libre et lié d'acétylcholine. *C.R. Acad. Sci. Paris* 273, 233-236.
- DUNANT, Y., GAUTRON, J., ISRAËL, M., LESBATS, B. et MANARANCHE, R. (1972). Les compartiments d'acétylcholine de l'organe électrique de la Torpille et leurs modifications par la stimulation. *J. Neurochem.* 19, 1987-2002.
- DREYFUS, P.M. and HAUSER, G. (1965). The effect of thiamine deficiency on the pyruvate decarboxylase system of the central nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 104, 78-84.
- DUNANT, Y., GAUTRON, J., ISRAËL, M., LESBATS, B. et MANARANCHE, R. (1974a). Evolution de la décharge de l'organe électrique de la Torpille et variations simultanées de l'acétylcholine en cours de la stimulation. *J. Neurochem.* 23, 635-643.

- DUNANT, Y., ISRAËL, M., JIROUNEK, P., LESBATS, B. and MANARANCHE, R. (1974b). Sustained oscillations of acetylcholine during nerve stimulation. *Nature* (London) 252, 485-486.
- DUNANT, Y. (1976). Force électromotrice, variation de la conductance et libération d'acétylcholine dans l'organe électrique de Torpille. *C.R. Acad. Sc. Paris* 282, série D, 763-766.
- DUNANT, Y, and HIRT, L. (1976). A rapid radiochemical assay for acetylcholine. *J. Neurochem.* 26, 657-659.
- DUNANT, Y., ISRAËL, M., LESBATS, B. and MANARANCHE, R. (1977). Oscillation of acetylcholine during nerve activity in the Torpedo electric organ. *Brain Res.* 125, 123-140.
- FELDBERG, N., FESSARD, A. and NACHMANSOHN, D. (1940). The cholinergic nature of the electric organ of Torpedo (Torpedo marmorata). *J. Physiol.* 97, 3P.
- FESSARD, A. (1946). Some basic aspects of the activity of the electric plate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 47, 501-514.
- FONNUM, F. (1966). A radiochemical method for the estimation of choline acetyltransferase. *Biochem. J.* 100, 479-484.
- FONNUM, F. (1968). Choline acetyltransferase binding to and release from membranes. *Biochem. J.* 109, 389-398.

- FONNUM, F. (1969). Isolation of choline esters from aqueous solutions by extraction with sodium tetraphenylboron in organic solvents. *Biochem. J.* 113, 291-298.
- FONNUM, F. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 24, 407-409.
- FOX, J.M. and DUPPEL, W. (1975). The action of thiamine and its di- and triphosphates on the slow exponential decline of the ionic currents in the node of Ranvier. *Brain Res.* 89, 287-302.
- GAITONDE, M.K. and FAYEIN, N.A. (1973). Decreased metabolism in vivo of glucose into amino acids of the brain of thiamine-deficient rats after treatment with pyriethamine. *J. Neurochem.* 24, 1215-1223.
- GALZIGNA, L. (1969). The synaptolytic effect of thiamine related to its interaction with neurotransmitters. *Biochem. Pharmacol.* 18, 2485-2493.
- GOLDBERG, D.J. and COOPER, J.R. (1975). Effects of thiamine antagonists on nerve conduction. I. Action of antimetabolites and fern extract on propagated action potentials. *J. Neurobiol.* 6, 435-452.
- GOLDBERG, D.J., BEGENISCH, T.B. and COOPER, J.R. (1975). Effects of thiamine antagonists on nerve conduction. II. Voltage clamp experiments with antimetabolites. *J. Neurobiol.* 6, 453-462.

- GUBLER, C.J., ADAMS, B.L., HAMMONDS, B. et al. (1974). Effect of thiamine deprivation and thiamine antagonists on the level of gamma-aminobutyric acid and 2-oxoglutarate metabolism in rat brain. *J. Neurochem.* 22, 831-836.
- GURTNER, H.P. (1961). Aneurin und Nervenenerregung. Versuche mit ³⁵S-markierten Aneurin und Aneurin-Metaboliten. *Helv. Physiol. Acta Suppl.* XI, 1-48.
- HARVEY, A.M. and MacINTOSH, F.C. (1940). Calcium and synaptic transmission in a sympathetic ganglion. *J. Physiol., Lond.*, 408-416.
- HASEGAWA, E., TAMAKI, T., TANAKA, T. and FUJITA, A. (1957). Studies on thiamine decomposing thermostable factors. III. On a reaction product produced by the reaction between thiamine and rutin. *J. Vitaminol.* 3, 30-38.
- HASHITANI, A. and COOPER, J.R. (1972). The partial purification of thiamine triphosphatase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 247, 2117-2119.
- HEINRICH, C.P., STADLER, H. and WEISER, H. (1973). The effect of thiamine deficiency on the acetyl coenzymeA and acetylcholine level in the rat brain. *J. Neurochem.* 21, 1273-1281.
- ISRAËL, M., GAUTRON, J. et LESBATS, B. (1968). Isolement des vésicules synaptiques de l'organe électrique de la Torpille et localisation de l'acétylcholine à leur niveau. *C.R. Acad. Sci. Paris* 266, série D, 273-275.

ISRAËL, M. (1970). Localisation de l'acétylcholine des synapses myoneurales et nerf-électroplaque. Arch. An. Microscopique et Morph. Exp. 59, 67-98.

ISRAËL, M. and TUCEK, S. (1974). Utilization of acetate for the synthesis of acetylcholine in the electric organ of Torpedo. J. Neurochem. 22, 487-491.

ISRAËL, M., MANARANCHE, R., MASTOUR-FRACHON, P. and MOREL, N. (1976). Isolation of pure cholinergic nerve endings from the electric organ of Torpedo marmorata. Biochem. J. 160, 113-115.

ISRAËL, M., LESBATS, B., MANARANCHE, R., MARSAL, J., MASTOUR-FRACHON, P. and MEUNIER, F.M. (1977). Related changes in amounts of ACh and ATP in resting and active Torpedo nerve electroplaque synapses. J. Neurochem. 28, 1259-1267.

ITOKAWA, Y. and COOPER, J.R. (1970). Ion movements and thiamine in nervous tissue. I. Intact nerve preparations. Biochem. Pharmacol. 19, 985-992.

ITOKAWA, Y. and COOPER, J.R. (1970). Ion movements and thiamine. II. The release of the vitamin from membrane fragments. Biochim. Biophys. Acta 196, 274-284.

ITOKAWA, Y., SCHULZ, R.A. and COOPER, J.R. (1972). Thiamine in nerve membranes. Biochim. Biophys. Acta 266, 293-299.

- ITOKAWA, Y. and COOPER, J.R. (1976). Electrophoretic separation and fluorometric determination of thiamine and its phosphate esters. *Methods in Enzymology* 18, 91-92.
- JANSEN, B.C.P. (1936). A chemical determination of aneurin by the thiochrome reaction. *Réc. Trav. Chim.* 55, 1046-1052.
- JONES, D.G. (1975). *Synapses and Synaptosomes*, ed. by Chapman and Hall Ltd., London.
- KATO, A.C., LEFRESNE, P., BERWALD-NETTER, Y., BEAUJOUAN, J.-C., GLOWINSKI, J. and GROS, F. (1977). Choline stimulates the synthesis of ACh by acetate and accumulation of acetate in a cholinergic neuroblastoma clone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 78, 350-356.
- KATZ, B. (1969). *The release of neurotransmitter substances*. Liverpool University Press, Liverpool.
- KAWASAKI, C. (1963). Modified Thiamine Compounds. In "Vitamins and Hormones" 21, 69-111, ed. by Harris, R.S. and Thimann, K.V., Acad. Press, N.Y.
- KODA, A., NAGAI, A., WATANABE, S., SUZUKI, Y. and ITO, M. (1971). The pharmacological actions of vitamin B₁ and the related compounds. *Ann. Proc. GIFU* 20, 54-57.
- KUNZ, H.A. (1956). Über die Wirkung von Antimetaboliten des Aneurins auf die einzelne markhaltige Nervenfasern. *Physiol. Acta* 14, 411-423.

- LEFRESNE, P. (1974). Contributions à l'étude du métabolisme de l'acétylcholine dans les terminaisons nerveuses du néostriatum chez le rat. Thèse Université Paris VI.
- LEFRESNE, P., BEAUJOUAN, J.-C. and GLOWINSKI, J. (1978). Evidence for extramitochondrial pyruvate deshydrogenase involved in acetylcholine synthesis in nerve endings. *Nature (London)* 274, 497-500.
- LEWIN, L.M. and WEI, R. (1966). Microassay of thiamine and its phosphate esters after separation by paper chromatography. *Anal. Biochem.* 16, 29-35.
- LOHMANN, K. and SCHUSTER, P. (1937). Untersuchungen über die cocarboxylase. *Biochem. Z.* 294, 188-214.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.F. and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MacINTOSH, F.C. and PERRY, W.L.M. (1950). Biological estimation of acetylcholine. *Methods Med. Res.* 3, 78-92.
- MANN, P.J.G. and QUASTEL, J.H. (1940). Vitamin B₁ and acetylcholine formation in isolated brain. *Nature (London)* 145, 856-857.
- MARCHBANKS, R.M. and ISRAËL, M. (1971). Aspects of acetylcholine metabolism in the electric organ of Torpedo marmorata. *J. Neurochem.* 18, 439-448.

- MATSUKAWA, T. and YURUGI, S. (1953). On a new derivative of thiamine with cysteine. *Science* 118, 109-111.
- MINZ, B. (1938). Sur la libération de la vitamine B₁ par le tronc isolé du nerf pneumogastrique soumis à l'excitation électrique. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 127, 1251-1253.
- MOREL, N. (1976). Effect of choline on the rates of synthesis and of release of acetylcholine in the electric organ of *Torpedo*. *J. Neurochem.* 27, 779-784.
- MOREL, N., ISRAËL, M., MANARANCHE, R. and MASTOUR-FRACHON, P. (1977a). Isolation of pure cholinergic nerve endings from *Torpedo* electric organ. Evaluation of their metabolic properties. *J. Cell. Biol.* 75, 43-55.
- MOREL, N., ISRAËL, M. and MANARANCHE, R. (1977b). Determination of ACh concentration in *Torpedo* synaptosomes. *J. Neurochem.* 30, 1553-1557.
- MURALT von, A. (1947). Thiamine and peripheral neurophysiology. In "Vitamins and Hormones"; 5, 93-118, ed. by Harris, R.S. and Thimann, K.V., Acad. Press, N.Y.
- MURALT von, A. (1958). The role of thiamine (vitamin B₁) in nervous excitation. *Exptl. Cell. Res.* 5, 72-79.
- MYINT, T. and HOUSER, H.B. (1965). The determination of thiamine in small amounts of whole blood and serum by a simplified thiochrome method. *Clin. Chem.* 11, 617-623.

- NACHMANSOHN, D. and STEINBACH, H.B. (1942). Localization of enzymes in nerves. I. Succinic deshydrogenase and vitamin B₁. J. Neurophysiol. 5, 109-120.
- NOSE, Y., IWASHIMA, A. and NISHINO, H. (1976). Thiamine uptake by rat brain slices. in "Thiamine" ed. by Gubler, C.J., Fujiwara, M. and Dreyfus, P.M., p. 157-168.
- OGAWA, K., AGO, Y. and TANAKA, T. (1976). Ultrastructural cytochemistry of phosphatases related to thiamine metabolism. In "Thiamine" ed. by Gubler, C.J., Fujiwara, M. and Dreyfus, P.M. p. 229-239.
- PERRI, V., SACCHI, O. and CASELLA, C. (1970). Nervous transmission in the superior cervical ganglion of the thiamine-deficient rat. Quart. J. exp. Physiol. 55, 25-35.
- PETERS, R.A., RYDIN, H. and THOMSON, R.H. (1935). Brain respiration, a chain of reactions as revealed by experiments upon the catatorulin effect. Biochem. J. 29, 53-62.
- "Practical Fluorescence. Theory, methods and techniques". by Guibault, G.G., p. 312-314. Marcel Dekker, Inc. New York, 1973.
- RANVIER, L. (1878). Leçons d'histologie du système nerveux. Vol. 2, Paris : F. Savy.
- REYNOLDS, S.F. and BLASS, J.P. (1975). Normal levels of acetyl coenzymeA and of acetylcholine in the brains of thiamine-deficient rats. J. Neurochem. 24, 185-186.

- RINDI, G. and VENTURA, U. (1967). Phosphorylation and uphill intestinal transport of thiamine, in vitro. *Experientia* 23, 175-176.
- RISINGER, G.E. and PELL, F.E. (1965). On the question of biologically active fluorescent derivatives of thiamine. *Biochim. Biophys. Acta* 107, 374-379.
- ROSSI-FANELLI, A., IPATA, P.L. and FASELLA, P. (1961). On the distribution and transformation of thiamine and its phosphoric esters in biological material. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 23-27.
- RUBIN, P. (1970). The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol. Rev.* 22, 389-428.
- SACCHI, O., LADINSKY, H., PRIGIONI, I., CONSOLO, S., PERI, G. and PERRI, V. (1978). Acetylcholine turnover in the thiamine depleted superior cervical ganglion of the rat. *Brain Res.* 151, 609-614.
- SHARMA, S.K. and QUASTEL, J.H. (1965). Transport and metabolism of thiamine in rat brain cortex in vitro. *Biochem. J.* 94, 790-800.
- SILIPRANDI, D. and SILIPRANDI, N. (1954). Separation and quantitative determination of thiamine and thiamine phosphoric esters and their preparation in pure form. *Biochim. Biophys. Acta* 14, 52-61.

- SOMOGYI, J.C. (1956). Metaboliten und Antimetaboliten. Erg. med. Grundlagenforschg 1, 141-188, Georg Thieme, Stuttgart.
- SPECTOR, R. (1976). Thiamine transport in the central nervous system. Am. J. Physiol. 230, 1101-1107.
- TANAKA, C. and COOPER, J.R. (1968). The fluorescent microscopic localization of thiamine in nervous tissue. J. Histochem. Cytochem. 16, 362-365.
- TANAKA, C. ITOKAWA, Y. and TANAKA, S. (1973). The axoplasmic transport of thiamine in rat sciatic nerve. J. Histochem. Cytochem. 21, 81-86.
- WHITTAKER, V.P. (1959). The isolation and characterization of acetylcholine containing particles from brain. Biochem. J. 72, 694-708.
- WOSTMANN, B.S. and KNIGHT, P.T (1960). The effects of methyl alcohol on the conversion of thiamine to thiochrome. Experientia 16, 500-501.
- YAKAMURA, H.I. and SNYDER, S.H. (1973). High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. J. Neurochem. 21, 1355-1374.
- ZUBLER-FAIVRE, L. and DUNANT, Y. (1976). Sodium- and potassium adenosine triphosphatase of electric organ : Interaction with ouabain in situ, in a membrane fraction, and in its solubilized form". Mol. Pharmacol. 12, 1007-1018.

BIBLIOGRAPHIE DE L'AUTEUR

- EDER, L. and DUNANT, Y. (1975). "La thiamine et ses esters interviennent-ils dans le métabolisme de l'ACh ?". *Experientia* 31, 737.
- EDER, L., HIRT, L. and DUNANT, Y. (1976). "Relation entre l'acétylcholine et les phosphoesters de Thiamine". *Experientia* 32, 792.
- DUNANT, Y., EDER, L. and SERVETIADIS-HIRT, L. (1977). "Acetylcholine release : A radiochemical approach in Torpedo electric organ". *Experientia* 33, 803.
- EDER, L., HIRT, L. and DUNANT, Y. (1976). "Possible involvement of thiamine in acetylcholine release". *Nature* 264, 186-188.
- EDER, L., DUNANT, Y. and BAUMANN, M. (1978). "Localization of thiamine in cholinergic nerve terminals : an histofluorescence study in the electric organ of Torpedo". *J. Neurocytol.* 7, 637-647.
- EDER, L. and DUNANT, Y. (1978). "Involvement of thiamine in synaptic transmission". In "The Cholinergic Synapse", vol. 49. *Progress in Brain Research* ; ed. by S. Tucek (coeditors : Bernard, E.A., Collier, B., Kelly, J.S., Marchbanks, R.M., Rang, H.P. and Silver, A.). This communication has been presented at the "Cholinergic Synapse" Symposium, in Zinkov, May 1978.

